

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotropologie und
Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Physiologische Strategien zur Entwicklung salzresistenter Mais-
und Weizensorten**

Habilitationsschrift

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Christian Zörb

Gießen, 2006

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Bodenversalzung.....	1
1.2 Definitionen für Salzresistenz und Salztoleranz	3
1.3 Salztoleranz, halophile Organismen	8
1.4 Salzresistenz, pflanzliche Anpassungsstrategien	9
1.1 Na ⁺ -Exklusionsstrategien auf der Ebene von Geweben	10
1.2 Na ⁺ -Exklusionsstrategien auf zellulärer Ebene	11
1.3 Na ⁺ -Transportprozesse in Pflanzen	13
1.5 Problemstellung	15
2. Ergebnisse	17
2.1 Zweiphasige Modellvorstellung der Wachstumshemmung unter Salzstress	17
2.2 Proteinbiochemische Anpassung an unterschiedliche NaCl-Konzentrationen	19
2.3 Der Beitrag der Plasmalemma-H ⁺ -ATPase zur Wachstumshemmung unter Salzstress	23
2.4 Die Bedeutung der Natriumexklusion und deren Regulation für die Salzresistenz von Pflanzen.....	24
2.5 Gewebespezifische Na ⁺ -Exklusion aus Spross und Wurzel, Translokation aus Cortex und Stele, Inklusion	28
2.6. Entwicklung salzresistenter Maishybriden	30
3. Zusammenfassende Diskussion	34
3.1 Osmotischer Stress und Ionentoxizität als Komponenten des Salzstress	34
3.2 Das Proteom als Mittel zur Untersuchung von Salzstress	37
3.3 Wachstumshemmung unter Salzstress und Säure-Wachstums-Theorie	44
3.4 Die Rolle der Regulation des Na ⁺ /H ⁺ -Antiports	47
3.4.1 Molekulare Analyse des SOS1-Signalweges.....	50
3.4.2 Na ⁺ -Exklusion als Strategie zur Realisierung von Salzresistenz	53
3.4.3 Regulation der Na ⁺ -Exklusion.....	54
3.5 Entwicklung salzresistenter Maishybriden	56
3.5.1 Physiologische Parameter zur Verbesserung der Salzresistenz	56
3.5.2 Entwicklung salzresistenter Maishybriden durch Kombination beider physiologischer Eigenschaften	60
4. Zusammenfassung.....	65
5. Literatur.....	69
6. Danksagung	84

1. Einleitung

1.1 Bodenversalzung

Bodenversalzung ist die Folge einer Anreicherung von leicht löslichen Salzen wie Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat im Oberboden. Salzstress ist einer der wichtigsten limitierenden Faktoren für die Pflanzenproduktion weltweit. Das am häufigsten vorkommende Salz ist NaCl. Zu unterscheiden ist zwischen der Salzzufuhr durch NaCl-haltige Aerosole in Niederschlägen an Meeresküsten und der Zufuhr aus dem Grundwasser, die zu einer Salzanreicherung in Böden führt. Zudem kann Bewässerung zu einer künstlichen Bodenversalzung führen (Scheffer & Schachtschabel, 1998). Etwa 6% der gesamten Landfläche der Erde und ca. 30% der bewässerten Flächen sind weltweit von Bodenversalzung betroffen (siehe Abb. 1; Boyer, 1982; Szabolcs, 1987; Schmidhalter, 2004). Viele Länder wie Afghanistan, Pakistan, Syrien und China haben durch die fortschreitende Bodenversalzung vormals fruchtbare Regionen verloren.



Abbildung 1: Karte der weltweiten Verbreitung der Bodensalinität (verändert nach Szabolcs, 1987).

Grün: Landfläche; gelb: Gebiete mit Bodenversalzung.

Sehr häufig tritt Bodenversalzung in ariden Klimagebieten durch die Einflussnahme des Menschen auf. Vor allem dann, wenn unsachgemäß bewässert wird, d. h. wenn dem Boden mehr Salze zugeführt werden als Pflanzen benötigen, bzw. wenn Salze nicht ausgewaschen werden. Durch Aufwärtsbewegung und Verdunstung des Bodenwassers findet eine Anreicherung von Salzen im Oberboden statt. Durch die verminderte Vegetation ist die Bodendecke ungeschützt der Sonne ausgesetzt und trocknet daher sehr rasch und nachhaltig aus (Von der Ruhren, 2003). Letztlich führt Versalzung zu deutlichen Mindererträgen oder zu einer völligen Unfruchtbarkeit des Bodens. Die kulturbedingte Bodenversalzung kann verhindert werden, indem ausschließlich ionenarmes Bewässerungswasser verwendet wird und davon nicht mehr als erforderlich zugeführt wird.

Vom agrarökologischen Standpunkt aus sind saline Böden solche, die hohe Konzentrationen an löslichen Salzen in Böden oder Bodenhorizonten enthalten (Scheffer & Schachtschabel, 1998). Die Bodensalinität kann durch die elektrische Leitfähigkeit [EC-Wert] bestimmt werden, die Einheit ist Dezisiemens pro Meter (dS m^{-1}). Nach Richards (1954) ist ein Boden bei einem EC-Wert von größer als 4 dS m^{-1} als salin zu bezeichnen. Tabelle 1 zeigt die Ertragseinbußen aufgrund von Bodensalinität einiger Kulturpflanzen (Doorenbos & Kassam, 1979). Für die salzsensitive Kulturpflanze Mais ist allerdings schon bei einem EC-Wert von $2,5 \text{ dS m}^{-1}$ mit 10%igen Ertragseinbußen zu rechnen. Der Schwellenwert wurde bereits bei einem sehr niedrigen EC-Wert von $1,5 \text{ dS m}^{-1}$ ermittelt (Tab. 1). Bei einem EC-Wert von 10 dS m^{-1} kann bei Mais mit einem Totalausfall des Ertrags gerechnet werden. Diese Werte zeigen die Notwendigkeit einer Verbesserung der Salzresistenz von salzsensitiven Kulturpflanzen.

Tabelle 1

Ertragseinbußen verschiedener Nutzpflanzen aufgrund von Bodensalinität (nach Doorenbos & Kassam, 1979)

	Schwellenwert	Ertragsverlust 10%	Ertragsverlust 25%	Ertragsverlust 50%	Ertragsverlust 100%
Pflanzenart	EC (dS m ⁻¹)	EC (dS m ⁻¹)	EC (dS m ⁻¹)	EC (dS m ⁻¹)	EC (dS m ⁻¹)
Ackerbohne	1,0	1,5	2,3	3,6	6,5
Baumwolle	7,7	9,6	13,0	17,0	27,0
Mais	1,7	2,5	3,8	5,9	10,0
Hirse	4,0	5,1	7,2	11,0	18,0
Zuckerrübe	7,0	8,7	11,0	15,0	24,0
Weizen	6,0	7,4	9,5	13,0	20,0

1.2 Definitionen für Salzresistenz und Salztoleranz

Organismen haben grundlegend verschiedene Strategien entwickelt, mit Salz in ihrer Umgebung umzugehen. Salztolerante Organismen sind auf der Ebene der Organe, der Zelle oder der subzellulären Organisation (Cytoplasma) an erhöhte Salzkonzentrationen in ihrer Umgebung angepasst oder sogar darauf angewiesen. Salztoleranz erfordert physiologische und biochemische Anpassungen aller cytosolischen Komponenten an erhöhte Ionenkonzentrationen im Cytosol, wie sie z.B. durch veränderte Proteine und Enzyme bei Archeabakterien der Gattung *Halobacterium* erreicht werden (Tebbe et al., 2005). Pflanzen müssen sich an ihren jeweiligen Standorten behaupten. Den Halophyten stehen die Glycophyten gegenüber, die an Salzstandorten auch unter Ausschluss der Konkurrenz kaum oder keine Überlebenschance haben. Andererseits haben Halophyten wie auch Glycophyten ähnliche physiologische Strategien und Mechanismen entwickelt, um eine erhöhte Salzkonzentration im Cytosol zu umgehen.

Die Begriffe Toleranz und Resistenz werden vor allem in der englischsprachigen Literatur oft synonym verwendet oder nicht genau definiert, obwohl die physiologischen Grundlagen eindeutige Definitionsunterschiede zwischen Salzresistenz und Salztoleranz erforderlich machen.

(1) Larcher (1984) gibt eine grundlegende Definition für Stress. Er führt an, dass Stress stets eine außergewöhnliche Belastung ist, die nicht unbedingt lebensgefährlich sein muss aber immer ein Alarmverhalten des Organismus auslöst, sofern er sich nicht in einem Starrezustand befindet. Die Stressreaktion ist dabei ein Wettlauf der Anpassungs- oder Abwehrmechanismen mit destruktiven, zum Tod führenden Vorgängen im Protoplasma.

Die Reaktion des Protoplasma mag die Hauptkomponente der Anpassungs- oder Abwehrmechanismen ausmachen, sollte aber noch durch eine apoplastische Komponente ergänzt werden. Die Wachstumshemmung durch Salzstress ist zumindest auch auf die Reaktion apoplastischer Enzyme wie Extensine zurückzuführen. Diese allgemeine Stressdefinition von Larcher führt aber nicht zu einer klaren Unterscheidung zwischen Resistenz und Toleranz.

(2) Die Pflanzensoziologen Ellenberg (1974) und Landolt (1977) verwenden den Begriff Toleranz grundsätzlich nur dann, wenn Pflanzen in natürlichen salinen Habitaten wachsen. Durch eine pflanzensoziologische Analyse kann ihrer Meinung nach eine Einschätzung der Toleranz von Pflanzenspezies vorgenommen werden und durch qualitative Erhebung eine Toleranzzahl ermittelt werden. Die Toleranzzahl der Pflanzenspezies ermöglicht einen Vergleich der Toleranz der Pflanzen untereinander.

(3) Pasternak (1990) definiert für die Salztoleranz einen Schwellenwert. Er bestimmt dazu einen Wert, bei dem Pflanzen überleben und ihre Reproduktivität noch aufrecht erhalten

können. Das Überleben und die Reproduktivität einer Pflanze korreliert jedoch oft mit unterschiedlichem Salinitätslevel (Tazuke, 1997). Dennoch scheint diese Definition für Pflanzenökologen geeignet, um Überlebensstrategien für Wildpflanzen zu untersuchen (Koyro, 2003).

(4) Von vielen Ökophysiologen wird die Biomasse-Produktion von Kontrollpflanzen und salzgestressten Pflanzen dazu herangezogen, um Toleranz zu erfassen. Hierbei wird ein Verhältnis des Pflanzenwachstums unter salinen und Kontrollbedingungen in Prozent der Biomasse während einer Zeitperiode ermittelt. Die Salzkonzentration, die zu einer Wachstumsdepression von 50% führt, wird als Schwellenwert für eine Salinitäts-Toleranz festgelegt (Kinzel, 1982). Die Betrachtung folgt der Michaelis-Menten-Beziehung, da die Schwierigkeit, das obere Limit der Salinitätswirkung zu ermitteln, analog der asymptotischen Form der Sättigungskurve einer Enzymkinetik ist. Eine auf diese Art ermittelte Wachstumsdepression ist zwar vergleichsweise beliebig, aber sie führt zu einem Vergleichswert, der zumindest für ökonomisch nutzbare halophile Pflanzen herangezogen werden kann (Koyro, 2003).

(5) Die Zusammenhänge der Salztoleranz-Mechanismen bei Kulturpflanzen werden von Greenway & Munns (1980) und Marschner (1995) hingegen in engen Zusammenhang mit den Fähigkeiten von Pflanzen zur Inklusion oder Exklusion von Na^+ gebracht. Eine Adaptation der Inkluder führt danach zu einer „Toleranz im Gewebe“. In diesem Zusammenhang werden dort auch Wechselwirkungen von Na^+ mit K^+ und Ca^{2+} diskutiert und somit ein weiterer physiologischer Zusammenhang von Salztoleranz und der Zusammensetzung der Mineralstoffe in der Pflanze hergestellt. Das Ionenungleichgewicht in Folge einer Ionentoxizität wird als Na^+ - oder Cl^- -Toxizität oder als Kalium- oder Calciummangel erörtert.

(6) Nach Läuchli und Epstein (1990) gründet Stress auf vom Normalen abweichende Umweltbedingungen, welche eine Reaktion der Pflanze hervorrufen, die zu einer Verminderung der Expression des vollen genetischen Potenzials für Wachstum, Entwicklung und Reproduktion führten. Besonders im Bezug auf Glycophyten sehen die Autoren keine klaren definititorischen Unterschiede zwischen Toleranz und Sensitivität. Gerade aber Genotypen innerhalb einer Spezies können bezüglich ihrer Sensitivität beträchtlich differieren. Die Sensitivität einer Pflanze kann definiert werden durch einen Punkt oder Bereich im Stresskontinuum, in dem die Pflanze im Wachstum nachteilig beeinträchtigt wird. Die Sensitivität ist aber nicht allein von der Intensität des Stressses abhängig, sondern ebenso von der Art des Salzes, Umgebung, Temperatur, Lichtintensität, Luftfeuchtigkeit und vielen anderen Faktoren.

(7) Pflanzen, die eine erhöhte Salzkonzentration in physiologisch aktiven Kompartimenten vermeiden, verfolgen damit eine „Avoidance-Strategie“ (Munns, 2002). Hohe Salzkonzentrationen ($> 0,3-0,5 \text{ M NaCl}$) verändern die Hydrophobizität, verschieben die elektrostatische Balance von Proteinen und inhibieren somit die meisten Enzyme (Wyn Jones & Pollard, 1993). Selbst halophile Pflanzen wie Mangroven haben niedrige Na^+ -Konzentrationen im Cytosol und auch im Xylemsaft (Ball, 1988). Es handelt sich daher bei diesen Pflanzen nicht um eine echte Toleranz im engeren Sinne.

Biologischer Stress wird von Levitt (1980) als Folge einer durch einen Umweltfaktor verursachten Schädigung oder Strapazierung einer lebenden Zelle definiert. Nach Levitt (1980) setzt sich **Stressresistenz** aus den beiden Komponenten **Stressvermeidung** (Avoidance) und **Stresstoleranz** zusammen. Wenn auch beide Komponenten der

Stressresistenz nicht unbedingt in ein und derselben Pflanze entwickelt wurden tauchen nach Levit drei Typen von Stressresistenz bei Pflanzen auf:

1. Stresstoleranz, nicht aber Vermeidung
2. Stresstoleranz mit gleichzeitiger Vermeidung
3. Stressvermeidung, nicht aber Toleranz

Toleranz ist nach Levit die ursprünglichere Entwicklung, wohingegen Vermeidung eine fortgeschrittenere Anpassung darstellt. Vermeidende Organismen können sowohl ein Gleichgewicht im Stresszustand als auch im Normalzustand herstellen und verfügen somit über komplexere physiologische Mechanismen bei Stress nicht nur zu überleben sondern auch Metabolismus, Entwicklung und den kompletten Lebenszyklus zu managen. Auf der anderen Seite erlaubt **Toleranz** lediglich das Überleben während der Zeit des Stresses und die Pflanze kann erst nach dem Stress wieder zu normaler metabolischer Aktivität, Wachstum und Entwicklung zurückkehren.

Zusammenfassend sollte im Bezug auf die Salzsensitivität höherer Pflanzen, im Speziellen der von Gramineen, die Definition von Levitt (7) heranziehend, von einer **Salzresistenz** ausgegangen werden. Die glycophytische Pflanze kann nicht in einer Umgebung mit einer hohen NaCl-Konzentration überleben. Daher versucht die Pflanze die Belastung durch den Salzstress zu vermeiden und folgt dabei der Avoidance Strategie. Na^+ wird aus der Zelle ferngehalten. Aufgenommenes Na^+ wird exkludiert oder vermindert aufgenommen, oder in der Vakuole kompartmentiert. Auch im Sinne von Munns (2002) ist die Vermeidung von hohen Na^+ -Konzentrationen in physiologisch aktiven Kompartimenten eine klare „Avoidance-Strategie“. Da die Avoidance Reaktion deutlich von der Toleranz abzugrenzen ist, wird in dieser Arbeit folglich der Begriff Salzresistenz verwendet.

1.3 Salztoleranz, halophile Organismen

Viele Mitglieder der Urfamilie der Halobacteriaceae sind an das Leben unter glühender Sonne in tropisch-warmen, nahezu salzgesättigten Sole-Seen ausgezeichnet angepasst. Solche Situationen finden sich beispielsweise im Toten Meer mit seiner mindestens dreimolaren Salzkonzentration. Die Nutzung extremer ökologischer Nischen gelingt natürlich nicht ohne Entwicklung besonderer biologischer Eigenschaften. Die hohe Salzanreicherung, die bis zum Ausgleich der Konzentrationen im Zellinneren an das Außenmedium reicht, führt dazu, dass Proteine an die üblicherweise denaturierend wirkenden Ionenverhältnisse angepasst sind. Diese Anpassungen bestehen im Wesentlichen aus einem hohen Überschuss von etwa 20% an sauren Aminosäuren wie Asparaginsäure und Glutaminsäure. Anpassungen halobakterieller Proteine veranschaulichen, wie physiologische Funktionen durch veränderte Proteinstrukturen unter hoch-salinen Bedingungen gewährleistet werden können (Tebbe, et al., 2005). Proteine mit einem hohen Überschuss an sauren Aminosäuren haben bei physiologischen pH-Werten negative Ladungsdichten, zu deren Abschirmung hohe monovalente Ionenkonzentrationen notwendig sind (Wagner, 1995). Halobakterielle Proteine sind durch ihre Strukturbesonderheiten nicht nur gegen Salzdenaturierung geschützt, spezifische Ionen wie Kalium und Chlorid tragen sogar zu ihrer Eigenstabilisierung bei. Der ausgeprägte Halophilismus dieser Archeabakterien ist deshalb durch diese Strukturbesonderheit auf proteinbiochemischer Ebene einfach erklärbar (Yancey et al., 1982; Zörb et al., 2002). Die Verschiebung zu höheren Anteilen von sauren Aminosäuren in Proteinen resultiert in einer optimierten Funktionalität der Proteine bei hohen Salzkonzentrationen (Brown, 1990) und daraus folgend in einer echten **Salztoleranz**.

1.4 Salzresistenz, pflanzliche Anpassungsstrategien

Hohe NaCl-Konzentrationen belasten Pflanzen über die osmotisch bedingte Wasseraufnahme und durch spezifische Ionenwirkungen. In Salzböden ist Wasser osmotisch stark gebunden und mit zunehmender Salzkonzentration stetig schlechter für Pflanzen verfügbar. Durch einen Überschuss an Na^+ und Cl^- im Protoplasma entstehen dann Ionenungleichgewichte, vor allem von K^+ und Ca^{2+} gegenüber Na^+ , diese verursachen störende ionenspezifische Wirkungen auf Enzymproteine und Membranen (Serrano, 1994).

Viele Organismen sind auf hohe Salzkonzentrationen nicht angewiesen, können aber durchaus mit ihnen überleben. Halophyten sind Pflanzen, die gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen resistent sind. Im Meerwasser dominiert im Wesentlichen NaCl. Die Halophyten-Datenbank von Aronson (1989) führt 1560 Arten in 117 Familien auf; hierunter können Arten wie *Aster tripholium*, *Spartina alterniflora*, *Beta maritima* und *Salicornia europea* mit Meerwasser-Salzkonzentrationen zwischen 3% und 6% NaCl pro 100 ml Meerwasser leben (Huiskes, 1994). Obligate Halophyten (*Salicornia*, *Salsoda*, *Sueda*, *Haolcernum*), die ausschließlich an Salzstandorten gedeihen, werden durch mäßige Salzaufnahme im Wachstum gefördert. Erst bei starker Salzbelastung geht das Wachstum zurück, und Stresssymptome treten auf. Fakultative Halophyten können zwar Salzstandorte besiedeln, ihr physiologisches Optimum liegt jedoch im salzfreien- oder zumindest salzarmen Milieu. Fakultative Halophyten sind in den Familien der Süßgräser (Poaceae), Sauergräser (Cyperaceae) und Binsen (Juncaceae) vertreten. Aber auch bei den dicotylen Pflanzen findet sich eine große Zahl dieser Halophyten-Kategorie wie z.B. *Plantago maritima* und *Glaux maritima*. Weiterhin gibt es salzindifferente Pflanzen, die hauptsächlich auf salzfreien Böden vorkommen, aber auch etwas Salz vertragen wie z.B. Ökotypen von *Festuca rubra*, *Agrostis stolonifera* und *Atriplex hastata* (Larcher, 1984)

Halophyten haben Strategien entwickelt, um mit einer hohen Salzbelastung umzugehen, die für die meisten anderen Pflanzen tödlich wäre. Die funktionelle Anpassung der Halophyten besteht darin, den NaCl-Überschuss aktiv wieder auszuscheiden, nur dosiert aufzunehmen oder so zu kompartimentieren, dass er nicht den Stoffwechsel schädigt (Larcher, 1984).

1.4.1 Na⁺-Exklusionsstrategien auf der Ebene von Geweben

Morphogenetische Anpassungen einiger Pflanzen wie tote epidermale Blasenhaare (Absalzhaare) oder aktive Salzausscheidungsdrüsen tragen zur Beseitigung der überschüssigen Salzionen auf Gewebeebene bei. Die Beseitigung der salzbeladenen Absalzhaare wird durch mechanischen Abrieb und durch deren Ab- und Auswaschen durch den Niederschlag besorgt. Mangrovenpflanzen, Tamarisken und einige halophytische Gräser wie *Spartina* besitzen diese Art von Drüsen (Hill & Hill, 1976; Larcher, 1984).

An Salzstandorte effizient angepasste Pflanzen können das Salz aus der Bodenlösung bereits im Wurzelbereich abschirmen und so eine übermäßige Salzaufnahme vermeiden. Die Kontrollschranke hierfür ist der Casparische Streifen und das Plasmalemma der Wurzelzellen im Cortex. Dadurch ist der Xylemsaft dieser Pflanzen salzarm, das Gewebe der Wurzelrinde jedoch nicht. Jedoch schwankt die Qualität dieses Filtereffekts, da die Natrium-Aufnahme vom Membranaufbau abhängig ist. Diese Strategie der Exklusion an der Wurzeloberfläche ist als fundamentale Strategie anzusehen, da sie bereits das Eindringen von Na⁺ in den Gesamtorganismus unterbindet und nicht wie die übrigen Strategien erst einsetzt, nachdem Na⁺ schon in den Organismus gelangt ist (Schubert, 1990).

Bei Gerste wurde eine verstärkte Na⁺-Inklusion in Vakuolen der Wurzelcortexzellen belegt (Wegner & Raschke, 1994). Cortexzellen haben in der Regel eine höhere Kapazität für Na⁺ als z.B. Xylemparenchymzellen (eigene Veröffentlichung 4). Bei der Phaseolus-Bohne wurde

von Pitman et al. (1981) von einer Na^+ -Akkumulation in Zellen des Zentralzylinders berichtet. Diese Strategie kann in erster Linie in den Wurzeln, aber auch im Spross beobachtet werden. Na^+ -Ionen werden von den Xylemparenchymzellen aus dem Transpirationsstrom reabsorbiert und im Zentralzylinder angereichert (Kramer et al., 1977; Yeo et al., 1977).

Für Mais unter Salzstress konnte eine verstärkte Na^+ -Inklusion in den Cortexzellen nachgewiesen werden (unpublizierte Daten; Neubert, Zörb). Die Na^+ -Reabsorption aus dem Xylem in die Xylemparenchymzellen mag zwar ebenfalls typisch für Glycophyten wie Mais und Ackerbohne sein, unabhängig davon findet aber generell auch eine Na^+ -Inklusion in den Zellen des Zentralzylinders, auf dem Weg des Na^+ von der Endodermis zum Xylem statt.

1.4.2 Na^+ -Exklusionsstrategien auf zellulärer Ebene

Na^+ -Ionen sind für glycophytische Kulturpflanzen in Konzentrationen von mehr als etwa 60 mM toxisch (Bergmann, 1993) und müssen daher strikt vermieden werden. Die cytotoxischen Effekte von Na^+ haben zwei physiologische Ursachen. Zum einen ist dies durch die größere Hydrathülle von Na^+ im Vergleich zu K^+ begründet. Die Verdrängung von K^+ durch Na^+ in Enzymen und regulatorischen Proteinen führt zu einer Verminderung von hydrophoben Wechselwirkungen und verändert die Konformation in Proteinen (Wyn Jones & Pollard, 1983). Zum anderen kann Na^+ enzymatische Funktionen stören oder gar völlig inhibieren, entweder durch direkte Bindung an Enzyme oder durch eine Verdrängung von K^+ in deren aktiven Zentren (Serrano, 1996).

Die Pflanze hat einerseits die Möglichkeit Na^+ an der Zellmembran abzuschirmen und den Influx zu minimieren. Ist andererseits Na^+ bereits in die Zelle gelangt, stehen zur Vermeidung von cytotoxischen Effekten im Cytoplasma zwei weitere Strategien zur Verfügung: die gerichtete Na^+ -Exklusion über das Plasmalemma in den Apoplast und die Na^+ -Inklusion über den Tonoplast in die Zellvakuole. Die Strategie der Na^+ -Exklusion ist die fundamentale Strategie, da sie schon das Eindringen von Na^+ in das Cytoplasma der Zelle verhindert. Durch

die Na^+ -Exklusion am Plasmalemma müsste sich die Na^+ -Konzentration im Apoplast stetig erhöhen und der Druck, der durch den wachsenden Konzentrationsunterschied auf das Cytoplasma generiert würde, müsste ebenso ansteigen. Allerdings wurden nur geringe Na^+ -Konzentrationen im Apoplast festgestellt (Mühling & Läuchli, 2002). Weiterhin konnten molekularbiologisch nur in dikotylen Pflanzen SOS1-homologe Na^+/H^+ -Antiporter (salt overly sensitive) aus dem Plasmalemma, die für den Transport von Na^+ aus dem Cytosol in den Apoplast verantwortlich sind, identifiziert werden (Blumwald et al., 2000). Ein biochemischer Hinweis für die mögliche Existenz eines Na^+/H^+ -Antiporter aus dem Plasmalemma von Maiswurzeln konnte hingegen aus bisher unpublizierten Daten von Fortmeier (2000) abgeleitet werden.

Das Volumen der Vakuole ist viel größer als das des Cytosols, wobei die Zellvakuole aber wesentlich unempfindlicher gegenüber Na^+ ist als das Cytosol. Die Vakuole besitzt daher eine große Kapazität für die Akkumulation von toxischem Na^+ . Durch die Na^+ -Exklusion am Tonoplast wird in Folge eine Inklusion von Na^+ in Vakuolen erreicht. Da jedoch die Konzentration von Na^+ im Cytosol den kritischen Parameter darstellt, sollte besser von einer Na^+ -Exklusion d.h. einem Transport aus dem Cytosol in die Vakuole gesprochen werden. Molekularbiologisch wurden NHX-homologe Na^+/H^+ -Antiporter (**Na/H** exchange) aus dem Tonoplast, die für den Transport von Na^+ aus dem Cytosol in die Vakuole verantwortlich sind, für dikotyle und monokotyle Pflanzen nachgewiesen (Apse et al., 1999; Zörb et al., 2004).

Eine weitere Strategie auf der zellulären Ebene ist die Sukkulenz mit einer Kompartimentierung der toxischen Ionen, wobei Salz in den Vakuolen der Blattzellen gespeichert wird. Diese aktive, energieverbrauchende Aufkonzentrierung von Salz in der Vakuole und die Speicherung eines großen Wasservolumens sorgen für eine geringe Salzkonzentration im Cytosol. Die Volumenvergrößerung des Lösungsraums ermöglicht

somit eine Mengenanreicherung der Salzionen bei gleichzeitig nur mäßigem Konzentrationsanstieg. Beispiele für Halophyten mit hochsukkulenten Blättern oder Stängeln sind *Salicornia europaea* (Queller) und *Suaeda maritima* (Salzsode; Atkinson et al., 1967; Larcher, 1994).

1.4.3 Na⁺-Transportprozesse in Pflanzen

Aus der Bodenlösung gelangen die Na⁺-Ionen durch Diffusion oder mit dem strömenden Wasser zunächst in den frei zugänglichen Apoplast der Wurzel, das heißt in die Zellwände der Wurzelhaare und der Wurzelrindenzellen. Die Aufnahme ist bis dort hin passiv, nicht selektiv und reversibel. Der Casparische Streifen verhindert dann größtenteils die apoplastische Diffusion und somit das Eindringen von Kationen in die Stele. Um vom Apoplast in den Symplast zu gelangen müssen die Na⁺-Ionen die Plasmamembran überwinden. Der elektrochemische H⁺-Gradient ermöglicht eine passive Aufnahme von Na⁺-Ionen durch Ionenkanäle der Plasmamembran in die Wurzelzellen (Buschmann et al., 2000; Liu et al., 2000). Der Mechanismus für den Na⁺-Einstrom ist noch weitgehend unbekannt. Amtmann & Sanders (1998) vermuten in den spannungsabhängigen Ionenkanälen den Hauptaufnahmeweg von Na⁺-Ionen. Auch VICs (Voltage Insensitive Channels) bieten eine Möglichkeit für den Eintritt von Na⁺ in Zellen (Amtmann & Sanders, 1998). Gassmann et al. (1996) schlagen eine Kopplung des putativen K⁺-Transporters HTK1 mit Na⁺ anstelle von H⁺ vor, allerdings sollte die physiologische Rolle der HTK-Superfamilie in verschiedenen Pflanzen kritisch betrachtet werden. In *Arabidopsis* kontrolliert AtHTK1 die Verteilung von Na⁺ in Wurzel und Spross und wirkt der Na⁺-Akkumulation in Blättern entgegen. Die große Verfügbarkeit und der vermehrte Einstrom von Na⁺-Ionen unter Salzstress führen zu einem veränderten cytosolischen Na⁺/K⁺-Verhältnis und damit zur Na⁺-Toxizität (Blumwald et al., 2000).

Beim Transport von Na^+ aus dem Xylemparenchym in die Xylemgefäße handelt es sich um einen aktiven Transport, da die Konzentrationen im Xylemparenchym niedriger sind als in den Xylemgefäßen. Die Kationen müssen nun die Barriere der Plasmamembran überwinden, um in die angrenzenden Xylemgefäße zu gelangen. Von hier aus können Kationen erst in den Xylemstrom entlassen werden (Wegner & Raschke, 1994). Ein radialer Transport von den Endodermiszellen in den Zentralzylinder kann wegen des Casparischen Streifens nur symplasmatisch erfolgen. Aus dem Symplast können Na^+ -Ionen einerseits durch die Tonoplasten der einzelnen Zellen in deren Vakuolen übertreten und dort aus dem Verkehr gezogen werden, andererseits können die Ionen aus dem Symplast in den Xylemstrom übertreten, um von dort aus mit dem Transpirationsstrom in die pflanzlichen Gewebe verteilt zu werden.



Abbildung 2:

Na^+ -Toxizität an
einem älteren
Maisblatt

Na^+ wird im Spross durch den Transpirationsstrom im Xylem relativ schnell transportiert und kann nur über das Phloem in die Wurzeln zurücktransportiert werden. Die Rezirkulation von Na^+ in die Wurzel ist jedoch sehr begrenzt, so dass der Na^+ -Strom im Wesentlichen unidirektional ist und zu einer progressiven Akkumulation von Natrium in den älteren

Blättern führt (Tester & Davenport, 2003). Die Symptome der Na^+ -Toxizität zeigen sich demnach zuerst an alten Blättern, und beginnen mit Chlorosen der Blattränder und der Blattspitze, welche dann später nekrotisch werden (Abb. 2).

1.5 Problemstellung

Die Verbesserung der Salzresistenz von Kulturpflanzen ist ein seit langem angestrebtes Ziel von Pflanzenzüchtern, Physiologen und Molekularbiologen. Die Frage, warum bisher in diesem Bereich so wenige Verbesserungen erreicht wurden, muss kritisch diskutiert werden (Flowers & Yeo, 1995; Munns, 1993 Chinnusamy et al., 2005; Zhu, 2003). In den letzten Jahren führte die Verwendung von „quantitative trait loci“ (QTL) bei der Züchtung von Kulturpflanzen nur zu einer leichten Verbesserung der Erträge unter Salzstress (Munns, 2002, Epstein & Bloom, 2004). Die Aufmerksamkeit richtete sich dabei vor allem auf die Steigerung des Ertrags unter Salzstress, eine bessere Marktakzeptanz oder eine angepasste Phänologie, jedoch nicht auf die Salzresistenz *per se* (Gorham & Wyn Jones, 2002). Die Möglichkeiten der Molekularbiologie eröffneten die gezielte Einführung von Einzelgenen wie die des Na^+/H^+ -Antiporters (NHX) in Tomaten (Blumwald et al., 2000). Eine damit verbundene Verbesserung der Salzresistenz ist jedoch lediglich als ein Einzelaspekt anzusehen, welcher auf die spezifische Reaktion dieser Pflanze auf Salzstress zurückzuführen ist. Es hat sich gezeigt, dass der Salzresistenz ein multigen-vererbter, komplexer physiologischer Mechanismus zugrunde liegt, dem nicht oder nur teilweise mit der Veränderung eines Einzelgens zu begegnen ist. Insbesondere blieb die Verbesserung der Salzresistenz von Kulturpflanzen bisher nur ein hochgestecktes Ziel. Die Erforschung der Mechanismen der Salzresistenz bei Glycophyten auf physiologischer wie molekularer Ebene ist daher ein wichtiges wissenschaftliches Ziel für die Entwicklung von salzresistenten Kulturpflanzen.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Mechanismen an den Gramineen Mais und Weizen untersucht. Mais wie auch Weizen werden als salzsensitive Pflanzen eingestuft (Maas, 1977). Die Böden der großen Maisanbaugebiete sind besonders von Bodenversalzung betroffen (siehe Abb. 1), womit selbstverständlich auch die erhebliche wirtschaftliche Relevanz als Aspekt auftritt.

In dieser Arbeit werden folgende Fragen beantwortet:

- Ist die Wachstumshemmung unter Salzstress physiologisch durch osmotischen Stress oder durch Na^+ -Toxizität zu erklären?
- Kann die Analyse der Veränderung der Proteine aus Pflanzen unter Salzstress zum Verständnis der Salzresistenz beitragen?
- Ist die Regulation der H^+ -ATPase auf der Ebene der Transkription und der Translation eine Ursache für die Wachstumshemmung von salzgestressten Pflanzen?
- Welche Rolle spielt die Na^+ -Exklusion auf zellulärer- und Gewebeebene für die Salzresistenz?
- Kann eine Verbesserung der Salzresistenz bei Mais und Weizen erreicht werden?

2. Ergebnisse

2.1 Zweiphasige Modellvorstellung der Wachstumshehmung unter Salzstress

2.1.1 Originalarbeit, Veröffentlichung 1

Nachweis für eine Na^+ -Toxizität für das vegetative Wachstum von Mais (*Zea mays* L.) während der ersten Phase des Salzstress

Sümer A., Zörb C., Yan, F., Schubert S. (2004) Journal of Applied Botany and Food Quality 78, 135-139

Zusammenfassung

Salzstress reduziert pflanzliches Wachstum, besonders das von Glycophyten wie Mais (*Zea mays* L.). Nach dem von Munns (1993) entwickelten Zwei-Phasen-Modell ist das Wachstum in der ersten Phase des Salzstress im Wesentlichen von osmotischen Effekten beeinflusst, welche für die Wachstumsdepression verantwortlich gemacht werden. In einer zweiten Phase reichert sich Na^+ an und wirkt toxisch.

In dieser Studie wurde dieses Modell in der ersten Phase des Salzstress unter besonderer Berücksichtigung des Beitrags eines möglichen ionenspezifischen Effekts im Vergleich zum osmotischen Stress an einem relativ salzresistenten Maisgenotypen (Pioneer 3906) überprüft. Osmotischer Stress wurde in einer Wasserkultur durch die Applikation von 100 mM NaCl sowie durch äquivalente osmotische Potenziale, die mittels Polyethylenglycol (PEG 6000) erzeugt wurden, induziert. Das Wachstum des vierten Blattes war nach 5, 7 und 9 Tagen Stressapplikation in beiden Stress-Behandlungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen stark reduziert. Dies lässt auf eine Prävalenz von osmotischem Stress in der ersten Phase der Wachstumsreduktion schließen. Eine signifikant stärkere Reduktion des Blattwachstums unter NaCl im Vergleich zur PEG-Behandlung spricht für einen zusätzlichen Ioneneffekt. In einem

weiteren Experiment wurde unter Verwendung von verschiedenen Salzlösungen (NaCl, Na₂SO₄ und MgCl₂) in äquimolaren Konzentrationen und bei identischem osmotischem Potenzial (eingestellt mit PEG) ebenfalls eine Na⁺-Toxizität während der ersten Phase des Salzstresses gezeigt. Wir schlagen daher eine Modifizierung des Zwei-Phasen-Modells des Salzstresses für Mais vor.

2.2 Proteinbiochemische Anpassung an unterschiedliche NaCl-Konzentrationen

2.2.1 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 2

Die biochemische Reaktion von Mais (*Zea mays* L.) auf Salzstress kann nicht mit einer spezifischen Adaptation sondern mit nur einer Abmilderung von Symptomen erklärt werden.

Zörb C., Schmitt S., Neeb A., Karl S., Linder M., Schubert S. (2004) Plant Science 167, 91-100

Zusammenfassung

Mais wird als salzsensitive Pflanze eingestuft. Die biochemische Reaktion von Mais (*Zea mays* L.) auf Salzstress wurde zum ersten Mal auf dem Niveau der Proteinexpression in Wurzeln und Spross gezeigt. Wir verwendeten eine Na⁺-exkludierende Maisinzuchtlinie und niedrige NaCl-Konzentrationen, um die Effekte zu minimieren. Die Protein-Expressionsmuster wurden mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Hohe, wie auch niedrigkonzentrierte NaCl-Behandlung von Mais führte zu einer unerwartet hohen Anzahl an differenziell exprimierten Proteinen in Wurzeln und Spross. Moderater Salzstress (25 mM NaCl) führte jedoch ebenfalls schon zu einer differenziellen Expression von 31% der Sprossproteine und 45% der Wurzelproteine, ohne Effekte auf die Morphologie oder die Na⁺- und Cl⁻-Konzentrationen zu haben. Hochkonzentrierter Stress (100 mM NaCl) führte zu einer unkontrollierten Änderung der Expression von mehr als 80% der isolierten Proteine.

14 Proteine, deren Expression unter Salzstress erhöht war, wurden durch In-Gel-Verdau und anschließenden Peptid-Massenspektrometrischen Fingerprint durch ein Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight-Massenspektrometer (MALDI-TOF) identifiziert. Wir detektierten drei Gruppen von differenziell exprimierten Proteinen unter niedrigem Salzstress. (A) Proteine, welche bei der Proteinbiosynthese und

Proteinmodifikation als Kinasen involviert sind, (B) Enzyme des Kohlenstoff-Metabolismus und (C) Enzyme des Stickstoff-Metabolismus. Acht dieser 14 Proteine wurden bereits vorher in der Literatur sowohl auf der Ebene der Transkription, Translation oder im Metabolismus als unter Salzstress differenziell exprimiert aufgeführt. Unsere Daten sprechen dagegen, dass es bei Mais auf der Ebene der Proteine eine spezifische Adaptation an Salzstress gibt.

2.2.2 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 3

Die proteinbiochemische Reaktion salzresistenter und salzsensitiver Weizengenotypen zeigt ein vergleichbares Muster in der ersten Phase des Salzstresses

Saqib M., Zörb C., Schubert S. (akzeptiert, 2/2006) Journal Plant Nutrition and Soil Science

Zusammenfassung

Salinität hat einen zweiphasigen Effekt auf das pflanzliche Wachstum, zunächst mit einer osmotischen Komponente, die von der Salzkonzentration der Lösung abhängt, später mit einer Ionentoxizität, die mit der Ionenaufnahme in photosynthetisch aktives Gewebe verbunden ist. Um die Resistenzmechanismen in der ersten Phase des Salzstresses zu ermitteln, haben wir die proteinbiochemische Reaktion von salzresistenten und salzsensitiven Weizengenotypen (*Triticum aestivum* L.) nach 10-tägiger Behandlung mit 125 mM NaCl in der ersten Phase des Salzstresses untersucht. In einem zweiten Ansatz wurden die Weizengenotypen in der zweiten Phase des Salzstresses nach einer 30-tägigen Behandlung mit 125 mM NaCl untersucht. Die Genotypen zeigten nach 30 Tagen NaCl-Exposition signifikante Unterschiede der absoluten und relativen Spross- und Wurzeltrockenmassen. Die Genotypen SARC-1 sowie 7-Cerros produzierten maximale, respektive minimale Sprosstrockenmassen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Eine hochsignifikant negative Korrelation ($r^2 = -0,99$) wurde zwischen der Salzresistenz (% Sprosstrockenmasse unter Salinität im Vergleich zur Kontrolle) und den Na^+ -Konzentrationen der untersuchten Weizengenotypen festgestellt. Salzresistente wie salzsensitive Genotypen zeigten eine vergleichbare Reaktion auf proteinbiochemischem Niveau nach 10-tägiger Exposition mit 125 mM NaCl. Bei beiden Genotypen war die Expression von mehr als 50% der Proteine verändert, wobei die Unterschiede zwischen den Genotypen in Bezug auf Hochregulation oder Verminderung der Expression sowie Neusynthese oder Verschwinden von Proteinen nach Salzbehandlung nur 1-8 % betrug. Wir schlussfolgern, dass die initiale biochemische

Reaktion auf der Ebene der Proteine nach einer NaCl-Exposition in Weizen auf einer unspezifischen Reaktion und nicht auf einer stressspezifischen Adaptation beruht.

Im Druck: akzeptiert (2/2006) in Journal of Plant Nutrition and Soil Science

2.3 Der Beitrag der Plasmalemma- H^+ -ATPase zur Wachstumshemmung unter Salzstress

2.3.1 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 4

Limitiert die H^+ -Pumpaktivität der Plasmalemma-ATPase das Blattwachstum von Mais (*Zea mays* L.) während der ersten Phase eines Salzstress?

Zörb C., Stracke B., Tramnitz B., Denter D., Mühling K.-H. Yan F. and Schubert S. (2005) Journal of Plant Nutrition and Soil Science 168, 550-557

Zusammenfassung

In der ersten Phase eines Salzstress wird das Wachstum von Pflanzen hauptsächlich durch osmotischen Stress beeinträchtigt. Zur Klärung des Einflusses auf das Streckungswachstums von Maisblättern in der ersten Phase eines Salzstress wurde der Einfluss von NaCl auf die Genexpression und die Aktivität der H^+ -ATPase im Plasmalemma von Maisblättern (*Zea mays* L.) untersucht. Neuntägige Behandlung von Maispflanzen mit NaCl verminderte im Vergleich zu Kontrollpflanzen (1 mM NaCl) das Blattwachstum. Während die hydrolytische H^+ -ATPase-Aktivität unbeeinflusst blieb, wurde die Fähigkeit einen pH-Gradienten aufzubauen stark reduziert. Die Gesamt-mRNA der H^+ -ATPase war unverändert. Während jedoch die ATPase-Isoform *MHA1* signifikant vermindert war, wurde die Isoform *MHA4* auf dem mRNA-Niveau stark erhöht. Die Western-Blot-Analyse zeigte keine Veränderung der Menge des Gesamtproteins der H^+ -ATPase. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass die reduzierte Fähigkeit der H^+ -ATPase im Plasmalemma von unter Salzstress gewachsenen Blättern, einen pH-Gradienten aufzubauen, durch Genexpression der spezifischen Isoform *MHA4* verursacht wird. Diese Isoform weist eine geringere H^+ -Pumpeffizienz im Vergleich zu Isoformen auf, die unter Kontrollbedingungen gebildet werden. Wir schlagen daher vor, dass die reduzierte Fähigkeit der H^+ -ATPase, einen pH-Gradienten aufzubauen, an der Verminderung des Blattwachstums von Mais in der ersten Phase des Salzstress beteiligt ist.

2.4 Die Bedeutung der Natriumexklusion und deren Regulation für die Salzresistenz von Pflanzen

2.4.1 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 5

Molekulare Charakterisierung von Na^+/H^+ -Antiportern (*ZmNHX*) aus Mais (*Zea mays* L.) und deren Expression unter Salzstress

Zörb C., Noll A., Karl S., Leib K., Yan F. and Schubert S.; Journal of Plant Physiology (2005) 162, 55-66

Zusammenfassung

Es wurden sechs Vollängen-Gentranskripte *ZmNHX*1-6 von *Zea mays* L., welche homolog zu beschriebenen tonoplastenassoziierten Na^+/H^+ -Antiportern (NHX) sind, identifiziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz kodierte 538 - 545 Aminosäuren und wies eine hohe Homologie zu putativen Tonoplasten-assoziierten Na^+/H^+ -Antiportern höherer Pflanzen auf. Beim Vergleich auf Aminosäureebene rangierte die Homologie im Bereich von 78% bei *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1) bis zu 63% bei Tomate (LeNHX1). Andererseits war die Homologie der identifizierten Transkripte im Vergleich plasmamembran- oder mitochondrienmembran-assoziiierter Na^+/H^+ -Antiporter gering. Eine Amilorid-Bindungsstelle konnte in der Transmembran-Domäne M4 nachgewiesen werden. Phylogenetische Analysen ordneten die sechs Isoformen in zwei Gruppen: *ZmNHX*1,2,6 und *Arabidopsis* AtNHX1,2 sowie Reis OsNHX und Weizen TaNHX2, bilden je eine Gruppe. Die zweite Gruppe mit *ZmNHX*3-5 bildete ein Cluster mit *Arabidopsis* AtNHX4-6 und Tomate LeNHX2. Die Transkription der *ZmNHX*-Isoformen zeigten ein organ- und salzspezifisches Muster. Außerdem wurde ein genotypspezifisches Expressionsmuster der *ZmNHX*-Isoformen detektiert. Ein Genotyp war eine Maisinzuchtlinie mit effektiver Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche und Sprosssexklusion (NaExII). In der Wurzel konnte mittels Real-Time-

PCR-Experimenten ein linearer Anstieg der Expression von *ZmNHX* bei steigenden NaCl-Konzentrationen von 1 bis 100 mM nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der Expression von *ZmNHX* im Spross derselben Pflanzen gezeigt werden. Die F1-Hybride Pioneer 3906, die eine moderate Na⁺-Exklusion aufweist, zeigte keine Veränderung hinsichtlich der Expression von *ZmNHX*. Eine Beziehung der Expression von *ZmNHX* zur Salzresistenz von Mais wird in dieser Arbeit diskutiert.

2.4.2 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 6

Molekulare Charakterisierung von *PeNhaD1*: Das erste Mitglied einer NhaD-Na⁺/H⁺-Antiporter-Familie pflanzlichen Ursprungs

Ottow E.A., Polle A., Brosché M., Kangasjärvi J., Dibrov P., Zörb C. and Teichmann T. (2005) Plant Molecular Biology 58, 75-88

Zusammenfassung

PeNhaD1 kodiert einen putativen Na⁺/H⁺-Antiporter aus dem salzresistenten Baum *Populus euphratica*. Es handelt sich um die erste Charakterisierung eines Mitglieds der Gruppe der NhaD-Typ-Ionentransporter-Familie pflanzlichen Ursprungs. Homologie-Vergleiche zeigen eine enge Verwandtschaft mit den als funktionell charakterisierten, mikrobiellen Na⁺/H⁺-Antiportern VpNhaD und VcNhaD. Na⁺/H⁺-Antiporter nehmen eine wichtige Rolle bei der Salzresistenz von Pflanzen und Bakterien ein. Expressionsstudien an *P. euphratica* und der salzssensitiven *Populus x canescens* zeigten, dass das Transkriptlevel von *PeNhaD1* unter Salzstress nur in der salzresistenten Pappel aufrecht erhalten werden.

Um einen tieferen Einblick in die putative Funktion von *PeNhaD1* zu erhalten, wurden Komplementations-Studien mit dem mutanten, salzsensitiven *Escherichia coli*-Stamm EP432 durchgeführt. In diesem Stamm sind die beiden Na⁺/H⁺-Antiporter *nhaA* und *nhaB* durch eine Mutation ausgeschaltet. Durch die Einführung von *PeNhaD1* in den Stamm EP432 konnten die Bakterien sogar unter 400 mM NaCl wachsen. Dies zeigt die protektive Funktion von *PeNhaD1*. Die Wachstumsraten von EP432 waren am höchsten bei pH 5,5 während bei pH 7,0 und pH 8,0 kein Wachstum beobachtet werden konnte. Die pH-Wert-Abhängigkeit lässt schließen, dass die Antiporteraktivität streng pH-Wert abhängig ist. Eine Elementanalyse von EP432-Zellen, die durch *PeNhaD1* komplementiert wurden und unter Salzstress standen, zeigte, dass die Salzresistenz mit einer signifikanten Reduktion der Natrium-Akkumulation

korreliert. Die Schlussfolgerung ist, dass *PeNhaD1* eine wichtige Rolle bei der Salzresistenz von *P. euphratica* spielt.

2.5 Gewebespezifische Na^+ -Exklusion aus Spross und Wurzel, Translokation aus Cortex und Stele, Inklusion

2.5.1 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 7

Die Expression eines endogenen, vakuolären Na^+/H^+ -Antiporters in Wurzeln und Spross von Weizen (*Triticum aestivum*) trägt zur Salzresistenz bei

Saqib M., Zörb C., Rengel Z., Schubert S. (2005) Plant Science (169, 959-965).

Zusammenfassung

Die Inhibition des Wachstums unter Salzstress ist einer der offensichtlichsten Effekte der Na^+ -Toxizität. Der vakuoläre Na^+/H^+ -Antiport wurde als wichtiger Mechanismus für die Sequestrierung von Na^+ in die Vakuolen beschrieben, wodurch toxische Effekte im Cytoplasma vermieden werden können. In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen der Expression des Na^+/H^+ -Antiporters und der Salzresistenz von zwei Weizengenotypen (*Triticum aestivum*) untersucht, die hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Na^+ -Aufnahme an den Wurzeln und der Translokation in den Spross differieren. Der Genotyp SARC-1 zeigte die niedrigere Na^+ -Aufnahme in den Wurzeln und Translokation in den Spross und war damit salzresistenter hinsichtlich der absoluten und relativen Sprossfrischmasse-Produktion. Zwar zeigte der salzsensitive Weizengenotyp SARC-1 im Vergleich zum salzresistenten 7-Cerros signifikant höhere Na^+ -Konzentrationen in jungen Blättern, aber eine ähnliche in mittleren Blättern und eine signifikant niedrigere Na^+ -Konzentration in alten Blättern. Die Expression des vakuolären Na^+/H^+ -Antiporters in Wurzeln und Spross des salzresistenten SARC-1 war signifikant höher als im salzsensitiven Genotyp 7-Cerros. Dennoch zeigten sich innerhalb der Genotypen selbst kleine Unterschiede in der Expression des vakuolären Na^+/H^+ -Antiporters beim Vergleich von Spross mit Wurzelcortex und Wurzelstete. Die höhere Expression des

vakuolären Na^+/H^+ -Antiporters in Wurzel und Spross des salzresistenten Weizengenotyps fördert die Exklusion von Na^+ aus dem Cytosol der Sprosszellen.

2.6. Entwicklung salzresistenter Maishybriden

2.6.1 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 8 (Manuskript)

Eine erfolgreiche Strategie zur Entwicklung von salzresistentem Mais

Zörb C., Neubert A.B., Schubert S. (Manuskript)

Zusammenfassung

Salzresistenz ist ein multigen vererbtes Merkmal. Die Entwicklung von salzresistentem Mais hat in der Vergangenheit nur zu einem begrenzten Erfolg geführt, weil die Züchtung nicht auf die Salzresistenz *per se* fokussiert war. Die Na^+ -Exklusion ist ein kritischer und sehr wichtiger Mechanismus für die Salzresistenz; im Besonderen für Glycophyten wie Mais. Die Verbesserung der Na^+ -Exklusion allein führte jedoch nicht zu einer verbesserten Salzresistenz. Wir zeigen, dass die Salzresistenz von Mais eine Kombination von mindestens zwei Merkmalen ist, nämlich der Na^+ -Exklusion und der osmotischen Anpassung. Wir kombinierten die beiden Merkmale durch klassische Züchtung und erhielten SR-Hybriden mit deutlich verbesserter Salzresistenz. Diese SR-Hybriden wurden unter kontrollierten Bedingungen in Nährlösung unter hohen NaCl-Konzentrationen (150 mM) getestet und mit den zugehörigen Kontrollen verglichen. Die SR-Hybriden zeigten eine signifikant verminderte Wachstumsreduktion in der ersten Phase des Salzstress. Das Ergebnis bestätigt eine verbesserte osmotische Anpassungsfähigkeit. Die Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche war wesentlich erhöht und auch die Translokationsrate von der Wurzel in den Spross war im Gegensatz zum Elter Pioneer 3906 deutlich vermindert. Der Kornertrag wurde im Gefäßversuch ermittelt. Die SR-Hybriden zeigten eine geringere Reduktion des Kornertrags unter Salzstress im Vergleich zum Hybriden Pioneer 3906. Der als Bezugsgröße verwendete Hybride Pioneer 3906 zeigte im Vergleich zu handelsüblichen Genotypen auch

schon eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Salzresistenz. Unsere Untersuchungen zeigen klar dass ein überzeugender Fortschritt bei der Verbesserung der Salzresistenz von Mais möglich ist, indem die osmotische Resistenz und die Na⁺-Exklusion separat eingekreuzt werden.

Im Manuskript vorliegend zur Publikation vorgesehen

2.6.2 Originalarbeit, eigene Veröffentlichung 9

Die Funktion der Abscisinsäure und der osmotischen Anpassung für die Salzresistenz von Maishybriden während der ersten Phase der Wachstumsreduktion unter Salzstress

De Costa, J; Zörb C; Hartung W; Schubert S.

Physiologia Plantarum (akzeptiert)

Zusammenfassung

Die Studie ermittelt die möglichen Mechanismen der Salzresistenz von vier Mais (*Zea mays* L.) Hybriden (Pioneer 3906, SR03, SR12, SR13) während der ersten Phase des Salzstress. Die Pflanzen wurden in belüfteten Wasserkulturen mit 1 mM Na⁺ (Kontrolle) und 100 mM Na⁺ angezogen. Der Stress wurde in 25 mM Stufen implementiert, die Pflanzen wurden zwei Tage nach dem Erreichen von 100 mM Na⁺ geerntet. Bei allen Genotypen waren Spross- und Gesamtfrischmassen durch Salzstress signifikant reduziert. Die Blattfläche des vierten, unter Salzstress gebildeten Blattes, war bei SR13 und Pioneer 3906 signifikant reduziert, hingegen zeigten SR03 und SR12 keine signifikante Reduktion. Der Turgor im Spross aller vier Genotypen war durch die Erhöhung der Osmolarität im Xylemsaft unverändert. Dies deutet zumindest für die Hybriden SR03 und SR12 darauf hin, dass andere Mechanismen als der Turgor für die Salzresistenz verantwortlich sind. Die Konzentrationen primärer Assimilate (Glucose, Fructose und Saccharose) im Xylemsaft waren unter Salzstress signifikant erhöht. Die erhöhte Assimilat-Konzentration kann aber nicht für die Salzresistenz verantwortlich sein, da es bei den beiden anderen Hybriden keine diesbezügliche Veränderung gab. Die Konzentration der freien Abscisinsäure (ABA) und von ABA-Glucoseseiter (ABA-GE) in der Wachstumsregion des vierten Blattes erhöhte sich signifikant unter Salzstress in allen Hybriden. Die Blattfläche ausgedrückt in Prozent im Vergleich von 100 mM Na⁺, zur 1 mM Behandlung zeigte eine signifikante positive Korrelation mit der freien ABA-Konzentration

($R^2 = 0,78$) wie auch mit der Summe der freien ABA- und ABA-GE-Konzentration ($R^2 = 0,86$). Im Ergebnis zeigt diese Studie den Einfluss von ABA auf die osmotische Anpassung von Mais in der ersten Phase des Wachstums unter Salzstress. ABA beeinflusst zum einen die Verminderung der Sensitivität des Blattwachstums und hat zum anderen eine wachstumsfördernde Funktion.

Akzeptiert, *Physiologia Plantarum* (2006)

3. Zusammenfassende Diskussion

3.1 Osmotischer Stress und Ionentoxizität als Komponenten des Salzstresses

Salzböden sind meist durch erhöhte Gehalte an NaCl, Na₂CO₃ und/oder Na₂SO₄ gekennzeichnet. Pflanzen leiden unter salinen Bedingungen in zweierlei Hinsicht: erstens entsteht osmotischer Stress, zweitens verursachen hohe Ionenkonzentrationen eine Störung des Ionengleichgewichts im Gewebe (Munns, 1993). Wie in Veröffentlichung 1, Abb. 7 für Mais gezeigt wurde, dominiert in der ersten Phase der Wachstumsreduktion der osmotische Effekt, wobei zusätzlich eine Na⁺-induzierte wachstumshemmende Wirkung aufgezeigt werden konnte. Durch Polyethylenglycol (PEG) wurden isoosmotische Bedingungen geschaffen, die denen der jeweiligen Osmolarität der NaCl-Varianten entsprachen. Die Verwendung von PEG zur Simulation von osmotischem Stress in Wasserkultur wurde in der Vergangenheit vielfach diskutiert (Michael & Kaufmann, 1973; Hohl & Schopfer, 1991; Chazen et al., 1995). Ein Diskussionspunkt ist die Tatsache, dass die Berechnung des osmotischen Potenzials in der Nährlösung schwierig ist; ein weiterer kritisch diskutierter Punkt ist die getroffene Prämisse, dass PEG nicht von Pflanzenzellen aufgenommen wird und somit die Untersuchungen nicht beeinflusst. Für unsere Untersuchungen wurden isoosmotische Bedingungen für die Verwendung von PEG mit dem mittleren Molekulargewicht 6000 im Vergleich zu den jeweiligen osmotischen Potenzialen einer Salzlösung berechnet und auch im Labor gemessen (Veröffentlichung 1, Tab. 1). Die Zugabe von Salzen und PEG erfolgte stufenweise, um einen starken osmotischen Schock der Pflanzen zu vermeiden. Langfristige Wachstumsstudien anderer Autoren haben den Gebrauch von PEG 6000 validiert (Pérez-Alfocea et al., 1995). Die Induktion von osmotischem Stress durch die Applikation von Polyethylenglykol 6000 liefert somit eine sehr gute Vergleichsmöglichkeit mit der osmotischen Wirkung von Salzen wie NaCl, MgCl₂ und Na₂SO₄. Das Wachstum des sich unter Stress entwickelnden Blattes ist als einfacher und hoch sensibler Parameter sehr

gut für die Analyse von osmotischem Stress geeignet (Munns, 1993). In der durch osmotischen Stress geprägten ersten Phase der Wachstumsreduktion konnte keine Wechselwirkung mit anderen Kationen (Ca, K, Mg) gezeigt werden, die zu einem Mangel der betreffenden Nährstoffe in den mit 100 mM NaCl, 50 mM NaSO₄, oder 50 mM NaCl behandelten Pflanzen geführt hätte (Veröffentlichung 1, Abb. 4).

Für die Pflanzenernährung ist die Auswirkung von Salzstress auf die Verfügbarkeit, die Aufnahme den Transport und die Anreicherung von Elementen wie z.B. K⁺ und Ca²⁺ interessant. Maßnahmen zur Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit unter Salzstress können mittels züchterischer oder molekularbiologischer Ansätze bearbeitet werden. Salinität kann aufgrund einer Kationen-Konkurrenz zwischen Na⁺ einerseits und K⁺ und Ca²⁺ andererseits, Nährstoffmangel oder ein Ungleichgewicht in der Pflanze verursachen (Hu & Schmidhalter 1998). Da Salinität, wie auch Trockenstress, das Pflanzenwachstum über ein Wasserdefizit beeinflussen, ist K⁺ für die Aufrechterhaltung des Turgors wichtig. Nach Asch et al. (2000) sollten hohe K⁺ zu Na⁺-Verhältnisse die Resistenz gegenüber Salinität verbessern. Besonders unter Trockenheit kann K⁺ von der Pflanze als osmotisch wirksames Kation genutzt werden. Hohe Na⁺-Konzentrationen im Außenmedium führen zu einer Verminderung der K⁺-Konzentration im Gewebe vieler Pflanzen (Hu & Schmidhalter, 2004). Die Ursachen liegen darin begründet, dass ein Aufnahme-Antagonismus von Na⁺ gegenüber K⁺ in den Wurzeln existiert oder dass eine Beeinträchtigung von K⁺ durch Na⁺ beim Transport ins Xylem vorherrscht (Lynch & Läuchli, 1984) oder dass es eine Inhibition von Aufnahmeprozessen für K⁺ durch Na⁺ im Spross gibt (Suhayda et al., 1990). Daten aus Versuchen von Hu und Schmidhalter (1997) zeigen, dass Salinität auch die Akkumulation von K⁺ in Weizenblättern vermindert. Die Pflanze benötigt beträchtliche Mengen an K⁺ und Ca²⁺, um die Integrität und Funktion von Zellmembranen zu gewährleisten (Wei et al., 2003). Ca²⁺ hat einen zusätzlichen Einfluss auf die Stomatabewegung, die Zellwandsynthese und auf die Zellteilung und die Signaltransduktion bei Abwehr von biotischem sowie abiotischem Stress. Zudem ist die

geringe Mobilität von Ca^{2+} im Gewebe ein zusätzliches Problem, dass unter Mangel für Schlüsselfunktionen pflanzlicher Stoffwechselvorgänge limitierend sein kann (Mc Laughlin & Wimmer, 1999; Hu & Schmidhalter 2005). Umso wichtiger ist die Verwendung von geeigneten Pflanzen für die Erstellung von salzresistenten Hybriden. Die Elterngenerationen sollten die kritischen Konzentrationen für Nährelemente wie K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} unter Stressbedingungen nicht unterschreiten. Aus diesem Grund wurden die Kationen Konzentrationen für K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} stets zusammen mit der Konzentration von Na^+ bestimmt. Die erzeugten salzresistenten Maishybriden wiesen in der ersten Phase des Wachstums bei NaCl-Konzentrationen von bis zu 125 mM stets K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen auf die nicht unter den nach Bergmann (1993) festgelegten kritischen Konzentrationen lagen (Veröffentlichung 1, Abb. 4; Karl, 2002, Sehmisch 2004, Martin, 2004). Die Kationen-Konzentrationen der salzresistenten Weizengenotypen wurden ebenfalls bestimmt und wiesen keine kritischen Werte auf (unveröffentlichte Daten). Eine zu einem Mangel führende, durch Na^+ verursachte Wechselwirkung mit K^+ - oder Ca^{2+} ist somit für Mais in der ersten Phase des Wachstums nicht festzustellen.

Eine Ionentoxizität ergibt sich im Wesentlichen aus der Konkurrenz zwischen K^+ - und Na^+ -Ionen im Cytosol. Die cytosolische K^+ -Konzentration liegt im Allgemeinen im Bereich von 100 mM oder höher (Marschner, 1995). Hohe Na^+ -Konzentrationen im Cytosol führen zu einer Verdrängung von K^+ -Ionen an deren Bindungsstellen. Normalerweise ist K^+ das Kation, welches die negative Ladung von zellulären Metaboliten wie Proteinen und Nukleinsäuren und organischen Säuren ausgleicht. Die Aktivierung einer Vielzahl von Enzymen durch K^+ kann weder durch Na^+ noch durch andere Kationen adäquat und funktionell erreicht werden (Epstein & Bloom, 2005).

Bereits bei hohen Na^+ -Konzentrationen in der Nährlösung in der ersten Phase ist die Zunahme der Na^+ -Konzentration sowohl in Wurzeln als auch etwas verzögert im Spross, messbar

(Veröffentlichung 2, Abb. 1B). In der zweiten Phase des Salzstresses führt die durch Na^+ verursachte Ionentoxizität zu einer starken Reduktion des Wachstums und zu einer hohen Akkumulation von Na^+ in der Pflanze. In diesem Stadium zeigen sich dann Na^+ -Toxizitätsphänomene, die bei Mais und Weizen zunächst in älteren Blättern auftreten (siehe Abb. 2 und Veröffentlichung 7, Tab. 3). Die hohe Anreicherung von Na^+ hat in dieser Phase einerseits einen stark wachstumshemmenden Einfluss auf den jungen, wachsenden Spross, andererseits auch auf die alten Blätter, in die Na^+ verlagert wird. Die Wachstumsdepression verhindert die Entwicklung der Pflanze, zusätzlich zeigen metabolisch aktive, ältere Blätter Nekrosen, was schließlich auch zum Absterben schlecht angepasster Genotypen führen kann.

3.2 Das Proteom als Mittel zur Untersuchung von Salzstress

Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit der Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Genom einer Zelle oder eines Organismus exprimiert werden. Die Mehrzahl der Proteine einer Zelle ist im Cytoplasma lokalisiert. Anpassungsmechanismen der Pflanze spiegeln sich im Proteinmuster der Zelle wider. Unter Salzstress ist sowohl eine Neusynthese, eine Hochregulation, wie auch eine Herunterregulation von Proteinen, deren Expression unter Salzstress gestört ist, möglich. Na^+ -Toxizität kann zusätzlich zu strukturellen Veränderungen von Proteinen führen, die dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigt sind: Hier seien zum Beispiel Strukturänderungen in Proteinen genannt, deren Hydratisierung durch Na^+ gestört werden, oder Enzym-Wechselwirkungen mit Kationen, die durch Na^+ negativ beeinflusst werden (Läuchli & Lüttge, 2002). Die Signalkaskade, die durch abiotischen Stress ausgelöst wird, äußert sich in der Regel ebenfalls durch die Veränderung des Proteoms.

Die Proteomanalyse ist eine wichtige Ergänzung der Genomanalyse, weil die Regulation einer Zelle nicht nur auf der Ebene der Transkription erfolgt. Die Zelle reagiert auf Stress zusätzlich

mit der Regulation auf der Ebene der Translation und steuert somit Proteinquantität und Proteinqualität. Weitere Regulationsmöglichkeiten sind Phosphorylierung, Glycosylierung, Methylierung oder Ubiquitinylierung von Proteinen auf posttranslationaler Ebene. Diese Veränderungen können ebenfalls durch Proteomanalysen aufgedeckt werden (Xing et al., 2002).

Die Analyse von unter Salzstress differenziell exprimierten Proteinen in 2D-Gelen ist eine Möglichkeit, die physiologische Anpassung von Mais an Salinität zu untersuchen. Da Salzstress multigen vererbt wird (Shannon, 1984), ist es nötig, die beteiligten Proteine zu detektieren, zu isolieren und schließlich zu identifizieren. Die 2D-Gelelektrophorese ist dazu besonders gut geeignet. Die Proteinaufarbeitung für die 2D-Gelelektrophorese liefert mit der in Veröffentlichung 2 dargestellten Methode zweidimensionale Proteingele mit sehr hoher Qualität für Wurzel- und Sprossproteine von Mais und Weizen (Veröffentlichung 4, Abb. 3).

Durch eine computerbasierte Analyse wurden differenziell exprimierte Proteine detektiert, die sich mindestens um den Faktor zwei unterschieden (Veröffentlichung 2, Tab. 3). Bei einem differenziellen Vergleich des Proteoms von unter niedrigem bzw. hohem Salzstress angezogenen Maispflanzen mit den entsprechenden Kontrollen zeigten sich überraschende Ergebnisse. Hoher Salzstress (100 mM NaCl) führte zu einer differenziellen Expression von mehr als 80% der ca. 700 dargestellten Proteine. Diese Pflanzen zeigten erhöhte Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen und eine verminderte Biomasse. Niedriger Salzstress (25 mM) führte zu einer differenziellen Expression von 31% der Sprossproteine und 45% der Proteine der Wurzeln. Dabei waren weder die Kationen-Konzentrationen von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} noch die Cl^- -Konzentration der Pflanze in beiden Teilen verändert, auch die Biomassen waren nicht reduziert (Veröffentlichung 2, Tab. 2). Dies bedeutet, dass bei diesen Parametern noch keine physiologische Reaktion festgestellt wurde. Die gravierende differenzielle Änderung der

Proteinexpression unter niedrigem Salzstress in der ersten Phase ist nur mit einer hohen Plastizität des Stoffwechsels gegenüber NaCl-Stress zu erklären. Bei einer spezifischen Anpassung an Salzstress wäre mit einer Änderung von wenigen, gezielten Proteinen unter niedrigem Salzstress zu rechnen. Das unerwartete Ergebnis einer breiten Reaktion führt zu der Schlussfolgerung, dass Mais keine Möglichkeit für eine spezifische Anpassung einzelner Proteine an NaCl-Stress zeigt. Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass die Wurzel, als das zuerst von Salzstress betroffene Organ, stets stärker reagiert als der Spross. In einer neueren Untersuchung von Yan et al. (2005) konnte dies analog für Reiswurzeln, die für 24, 48 und 72 h unter 150 mM Salzstress gesetzt wurden, gezeigt werden. In dieser Untersuchung konnten 54 Proteinspots aus 2D Gelen identifiziert werden, die differenziell exprimiert waren und zumeist aus dem Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus stammten.

Um unter Salzstress differenziell exprimierte Gene oder Proteine aufzufinden, ist eine Applikation von hochkonzentriertem Salzstress bei salzsensitiven Pflanzen wie Mais nicht sinnvoll, da dies bereits zu einer unkontrollierten Expression von Proteinen (und Genen) führt. Untersuchungen an salzsensitiven Pflanzen sollten unter Applikation von niedrigen NaCl-Konzentrationen durchgeführt werden, um Proteine detektieren zu können, die direkt an Salzresistenzmechanismen beteiligt sind. Weiterhin ist eine Untersuchung der Proteine unter niedrigem Stress in Abhängigkeit von der Zeit sinnvoll, um auch die Proteine zu untersuchen, die direkt nach Applikation von NaCl verändert werden. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung schneller Änderungen nach der Applikation von 25 mM NaCl bei Mais. Die Veränderung von Proteinen kann in Wurzel und Spross schon nach 30 Minuten nachgewiesen werden. Nach erster Analyse einiger betroffener Spots auf den 2D-Gelen handelt es sich bei den veränderten Proteinen zu einem hohen Anteil um phosphorylierte Proteine. Proteinphosphorylierungen stellen schnelle molekulare Schalter dar, die es der Pflanze rasch ermöglichen auf Umwelteinflüsse zu reagieren. Die Anzahl der veränderten Proteine nimmt nach 60 Minuten ab und erreicht nach 7 Stunden einen Anteil von etwa 3%, was absolut ca.

30 veränderten Proteinen entspricht. Die schnelle differenzielle Expressionsänderung der Proteine nach bereits einer halben Stunde zeigt, dass die Maispflanze den osmotischen Schub an den Wurzeln registriert und mit einer veränderten Translation von diversen Proteinen reagiert. Es ist nicht zu vermuten, dass es sich hierbei um spezifisch translatierte Proteine handelt, die zur speziellen Anpassung an 25 mM NaCl dienen, da die Translationsänderung kurz darauf wieder auf ein Niveau von ca. 3% nach 8 h zurückreguliert wird. Der Beitrag dieser verbleibenden veränderten Proteine an der Salzresistenz von Mais kann z.B. einer durch Proteinphosphorylierung veränderten Signaltransduktion zugeschrieben werden, die wiederum zu einer Anpassung der physiologischen Reaktionen der Pflanze bei erhöhten Na^+ -Außenkonzentrationen führt. Hierbei ist im Speziellen an Signalglieder für die Signalkaskade zur Expression von Membrantransportern wie dem Na^+/H^+ -Antiporter zu denken. Eine Klärung dieser Frage wird aber erst die Identifikation der Proteine und deren Phosphorylierungszustände und deren Zuordnung der jeweiligen Funktion bringen. Die Datenlage der benötigten Datenbanken (z.B. MASCOT) lässt diese Zuordnung zur Zeit noch nicht gesichert zu.

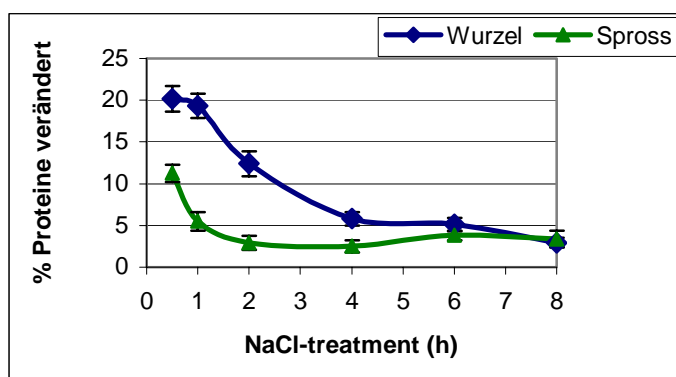


Abbildung 3.

Protein-Veränderungen in 2D-Gelen der Na^+ -exkludierenden Maisinzuchtlinie NaExII nach Applikation von 25 mM NaCl im Vergleich zur Kontrolle. Proteine wurden analog zur Veröffentlichung 2 extrahiert, zweidimensional aufgetrennt, gescannt und mit der DELTA2D-Software ausgewertet. Als verändert wurden nur solche Proteine angezeigt, die mindestens

um den Faktor zwei im Vergleich zur Kontrolle unter Salzbehandlung waren (unveröffentlicht).

Identifikation von Proteinen unter Salzstress

Ein Aspekt zum Verständnis der Salzresistenz von Pflanzen ist die Identifikation von Genen und Proteinen die an der Stressreaktion beteiligt sind. Die Datenlage für die Identifikation von Proteinen über massenspektrometrische Techniken (MALDI-TOF) ist für einige Modellpflanzen (*Arabidopsis*, Reis) gut, da die aus der Gendatenbank abgeleiteten Molekulargewichte der Proteine in der MASCOT-Proteindatenbank (<http://www.matrixscience.com>) zu finden sind. Für die meisten Kulturpflanzen wie Mais, Gerste und Kartoffel sind jedoch weit weniger Daten verfügbar. Die Situation verbessert sich aber stetig, da durch Sequenzierungsprojekte ständig neue Daten generiert werden. Es kann daher vorkommen, dass die genauen Massen eines 2D-Spots vorliegen, aber keine ausreichende Detektion in der Datenbank vorgenommen werden kann, weil zu diesem Zeitpunkt keine Daten des entsprechenden Proteins der betreffenden Pflanze vorliegen. Ein Vergleich mit heterologen Schwesterproteinen verwandter Pflanzen ist nur dann statthaft, wenn die Homologie hoch genug ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten Enzyme des Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalts, sowie Proteine, die bei der Proteinbiosynthese und deren Modifizierung involviert sind, identifiziert werden (Veröffentlichung 2, Tab. 3). Produkte der N-Assimilation und des Kohlenstoffhaushalts sind unter niedrigen NaCl-Stressbedingungen aber nicht limitierend für die Pflanze (Schubert et al., 1990). Daher können die Anpassungen der Proteine des Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalts nicht als spezifische Anpassungen an Salzstress gedeutet werden.

Proteine, die in der Proteinbiosynthese und -modifizierung involviert sind, tragen eventuell zu einer spezifischen Stressantwort bei. Einige der in der Veröffentlichung 2 (Tab. 3) genannten Proteine wurden auf Metabolom- oder Genomebene bereits in vorhergehenden Publikationen verschiedener Autoren mit Salzstress in Verbindung gebracht. Die gezielte Überexpression einzelner Proteine wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase verbesserte zwar die Salzresistenz von rekombinanten Kartoffeln (Jeong, 2001); ein derartiges Enzym aus dem Zuckerstoffwechsel kann jedoch nicht als primäre oder gar einzige Komponente zur Verbesserung der Salzresistenz angesehen werden, da Assimilate unter moderatem Salzstress nicht limitiert sind.

In Veröffentlichung 2, Tab. 3 konnte eine Serin/Threonin-Kinase aus Maiswurzeln detektiert werden, die bei der Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Rolle spielt. Im Signalweg des Na^+/H^+ -Antiporters (SOS1) der Plasmamembran von *Arabidopsis* hat auch eine Serin/Threonin-Kinase (SOS2) großen Einfluss in der direkten Signaltransduktionskaskade (Zhu, 2003). Die durch eine calmodulinähnliche Komponente (SOS3) aktivierte Serin/Threonin-Kinase (SOS2) reguliert die Aktivität von Na^+/H^+ Antiportern an der Plasmamembran, vermutlich auch die am Tonoplasten (NHX, Chinnusamy et al., 2005). Die Regulation durch SOS2 verändert die Kompartimentierung von Na^+ in der Vakuole und den Na^+ -Efflux der Zelle. Der Nachweis für ein SOS1-Homologon in der Plasmamembran von Maiszellen fehlt aber bisher.

Die physiologisch-biochemische Strategie der salzsensitiven Maispflanze scheint, zumindest nach Exposition mit moderatem Stress nach einigen Tagen, auf eine allgemeine „Symptomlinderung“, nicht jedoch auf eine spezifische Anpassung eingestellt zu sein. Dies ergibt sich aus der Reaktion, die einerseits auf osmotischen Stress, und andererseits auf die Wirkung von Na^+ zurückzuführen ist. Die schnellen Veränderungen im Proteom hingegen, die

nach einer halben Stunde moderaten Salzstress messbar sind (Abb. 3), sind jedoch in erster Linie auf die Wirkung von Na^+ zurückzuführen. In den ersten zwei bis drei Stunden wird die Veränderung der Proteine bei Mais dann auf ein Niveau von 3-5% zurückgefahren (Abb. 4). Die Hauptkomponente der ersten Phase des Wachstums bleibt jedoch im Wesentlichen auf osmotische Probleme fokussiert (Veröffentlichung 1). Die beiden Phasen sind nicht starr zeitlich festgelegt, sondern tragen zur konzeptionellen Erklärung des Verständnisses der Physiologie unter Salzstress bei.

Die Symptomlinderung mit einer nicht spezifischen physiologischen Reaktion in der ersten Phase ist die Folge der Kombination von osmotischem Effekt und Na^+ -Effekt und einer eventuell noch hinzukommenden dritten synergistischen Komponente, der Störwirkung beider Effekte. Hieraus ergibt sich die eigentliche Schwierigkeit für die Züchtung von salzresistenten Kulturpflanzen. Die multigen festgelegten pflanzeigenen Mechanismen der Salzresistenz können nicht oder nur sehr mühsam durch gezielte Einbringung von Einzelereignissen (d.h. Einzelproteinänderungen) vererbt werden. Die Pflanze reagiert plastisch auf den Stress, wobei die Einzelereignisse wie ein Netz miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig beeinflussen. Die Strategie, nicht Einzelereignisse, sondern komplexe physiologische Mechanismen zu nutzen, um eine Verbesserung der Salzresistenz zu erreichen, beschreibt einen sinnvollen Weg, Salzresistenz zu verstehen und zu verbessern.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass die Proteomanalyse einerseits die komplexen physiologischen Mechanismen von Salzstress aufzeigt, wobei eine Veränderung vieler Proteine nachgewiesen wurde, die aber nicht spezifisch auf Salzstress zurückzuführen war. Eine unspezifische Reaktion des Proteoms wurde aufgezeigt. Andererseits kann die Proteomanalyse ebenfalls aufzeigen, in welchem zeitlichen Stadium und bei welcher Höhe des Salzstress eine genauere Analyse des Proteoms sinnvoll ist. Für Mais scheint eine zeitliche Auflösung der Proteinveränderungen bis hin zu wenigen Stunden nach NaCl -

Applikation und die Reduktion auf 25 mM NaCl sinnvoll. Die schnelle Reaktion des Proteoms in der ersten halben Stunde deutet auf die von Na^+ ausgehenden Effekte in der Zelle hin. Die Proteomanalyse kann nur dann zum Verständnis von Salzstress beitragen, wenn sie in engem Zusammenhang mit physiologischen Resultaten diskutiert wird.

3.3 Wachstumshemmung unter Salzstress und Säure-Wachstums-Theorie

Generell kann eine starke Wachstumshemmung von glycophytischen Kulturpflanzen unter Salzstress beobachtet werden (Maas & Hofmann, 1977). Im Bodenversuch zeigt sich dies sichtbar zunächst am Spross. Auch im Wasserkulturversuch ist zunächst eine Verminderung der Sprossmasse erkennbar (Veröffentlichung 4, Abb. 1). Die Wurzel ist jedoch der Teil der Pflanze, der unmittelbar der Salinität ausgesetzt ist. Es wird daher vermutet, dass ein von der Wurzel kommendes Signal die Wachstumshemmung im Spross auslösen kann (Termaat et al., 1985; Rengel, 1992; Munns, 1993). Wahrscheinlich ist das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) an der Regulation der Sprossantwort des Wurzelsignals beteiligt (Munns & Cramer, 1996).

Das Wachstum von Zellen umfasst die Zellteilung und die Zellstreckung. Voraussetzungen für die Streckung der Zellen sind insbesondere die Zellwandextensibilität und der Turgor (Cosgrove, 1993). Unter salinen Bedingungen ist der Turgor für die Zellstreckung kein limitierender Faktor (Van Volkenburgh & Boyer, 1985), denn häufig treten gleiche oder sogar höhere Turgordrucke im Vergleich zu nichtsalinen Bedingungen auf (Schubert, 1990; Arif & Tomos, 1993; Cramer et al., 1998). Bei Gramineen wird vor allem das gehemmte Streckungswachstum der Zelle für das reduzierte Blattwachstum unter Salz- und Trockenstress verantwortlich gemacht (Cramer & Bowmann, 1992; Neumann 1993; Schmidhalter et al., 1998). So liefert die Hemmung der H^+ -Abgabe in die Zellwand, die zu einer verminderten Ansäuerung führt, eine Erklärung für die verminderte

Zellwandextensibilität (Hager, 2003). Die Säure-Wachstumstheorie besagt, dass Protonen, die in den Apoplast abgegeben werden, lockernd auf die Zellwand wirken (Hager et al., 1971). Eine Abgabe von Protonen in die Zellwand verringert den pH-Wert, dies aktiviert pH-sensitive Enzyme und Proteine, welche zellwand-lockernde Prozesse in Gang setzen (Taiz, 1984; Kutschera, 1994). Die Zellwandansäuerung durch die Plasmalemma- H^+ -ATPase aktiviert wiederum Expansine, Xyloglucan-Hydrolase, Xyloglucan-Endotransglycosylase und Yieldine (Cosgrove, 1993, Okamoto-Nakazato et al., 2001). Es kann dann neues Zellwandmaterial in die bestehende Zellwand eingelagert werden. Dieser Prozess ist in der Regel Auxin-vermittelt (Frias, 1996; Hager, 2003). Unter salinen Bedingungen stellten Cramer & Bowman (1992) und Neumann (1993) bei Mais fest, dass die Zellwandhärtung den eigentlich begrenzenden Faktor für das Streckungswachstum der Zelle darstellt.

Eine kurzzeitige NaCl-Behandlung der Pflanzen garantiert also, dass die gemessenen Effekte dem osmotischen Stress in der ersten Phase der Wachstumsreduktion zugeordnet werden können (Veröffentlichung 4). Die hohe NaCl-Konzentration im Wurzelmedium verursacht den osmotischen Stress. Die Zellexpansion in der Streckungszone, die sich bei Gramineen an der Blattbasis befindet (Kemp, 1980; Veröffentlichung 4), war schon nach einigen Stunden bis hin zu mehreren Tagen beeinträchtigt (Munns, 1993; Cramer et al., 1998; Hu et al., 2000; Munns et al., 2000). Es konnte durch histologische Untersuchungen gezeigt werden, dass nach neuntägiger Behandlung mit NaCl die Epidermisdicke in der Streckungszone um 34,3% gegenüber den Kontrollpflanzen reduziert wurde (Sümer, 2004). Tardieu et al. (2000) konnten ähnliche, durch Trockenstress verursachte Befunde zeigen. Die Entwicklung der Epidermiszellen ist demnach für die Zellstreckung ein empfindlicher Parameter (Hu et al., 2005; Veröffentlichungen 1 und 4). Auch die Anzahl der Epidermiszellen einer definierten Länge war bei der NaCl-Variante im Vergleich zur Kontrolle um 30,2% höher. Die kleineren Epidermiszellen sind auf eine verminderte Zellstreckung zurückzuführen (Sümer, 2004).

Die Plasmalemma-ATPase ist das Schlüsselenzym, welches für die Ansäuerung der Zellwand verantwortlich gemacht werden kann. Hierfür spricht, dass in expandierenden Blättern von Baumwollpflanzen maximale Streckungsraten mit maximalen Transkriptionsraten der H^+ -ATPase korreliert werden konnten (Smart et al., 1998).

In unserer Untersuchung zur Expression von H^+ -ATPasen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Plasmalemma- H^+ -ATPase in Blättern, die unter Salzstress gebildet wurden, reguliert wird (Veröffentlichung 2, Tab. 3). Zwar war die Expression aller Isoformen der H^+ -ATPase in der Summe fast unverändert, jedoch wurde die Transkription der Isoform *ZmMHA1* um ein Viertel vermindert, während die Isoform *ZmMHA4* um das Dreifache erhöht war.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Pumpaktivität der Plasmalemma- H^+ -ATPase in der Streckungszone von Mais vermindert war, wohingegen die hydrolytische Aktivität nicht beeinträchtigt wurde (Veröffentlichung 4, Tab. 2). Die Verminderung der H^+ -Pumpaktivität der Plasmalemma- H^+ -ATPase bei einer unveränderten hydrolytischen Aktivität unter Salzstress in der Streckungszone kann in einen Zusammenhang mit der verminderten Expression der Isoform *ZmMHA1* gebracht werden. Die Hochregulation der Expression der Isoform *ZmMHA4* auf das fast Dreifache reicht nicht aus, um die H^+ -Pumpaktivität in der Streckungszone aufrechtzuerhalten. Da diese Isoform durch NaCl induziert wird, jedoch die Pumpaktivität nicht aufrecht erhalten werden kann, muss sie als ineffizient H^+ -pumpende H^+ -ATPase-Isoform eingestuft werden (Veröffentlichung 5).

Hierbei ist die methodische Weiterentwicklung der Plasmalemma-Isolation aus Maisblättern mit sehr hohen Reinheitsgraden im Bereich über 90 % (Veröffentlichung 5, Abb. 4) hervorzuheben.

Vielfach wird über den stimulierenden Effekt von K^+ auf die ATPase berichtet, weil K^+ die Dephosphorylierung des Enzyms fördert (O'Neill und Spanswick, 1984; Briskin, 1986; Gibrat et al., 1990). In einem *in vitro*-Experiment wurden die Auswirkungen der Erhöhung der Konzentration von Na^+ bis zu äquimolaren Konzentrationen von 50 mM K^+ und 50 mM Na^+ überprüft. Diese Konzentrationen sind unter Salzstress noch auf physiologische Verhältnisse übertragbar. Selbst bei dieser Konzentration war die H^+ -Pumpaktivität gegenüber der Kontrolle um etwa 50% reduziert, während bei der hydrolytischen Aktivität keine nennenswerte Reduktion festgestellt werden konnte (Sümer, 2004, Abb. 45). Es wird vermutet, dass die Konkurrenz von Na^+ mit K^+ im Cytosol die Kopplung zwischen der H^+ -Pumpaktivität und der hydrolytischen Aktivität der H^+ -ATPase störend beeinflussen kann. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass die katalytische Region einerseits und der Pumpmechanismus des Enzyms andererseits unabhängig voneinander auf verschiedene Na^+ - und K^+ -Konzentrationen reagieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die reduzierte H^+ -Pumpaktivität der ATPase unter NaCl-Bedingungen eine Verminderung der Azidifizierung des Apoplasten bewirkt (Veröffentlichung 4). Dieser Prozess vermindert nach der Säure-Wachstums-Theorie die Zellwandextensibilität und limitiert somit das Streckungswachstum des Blattes. Folglich ist eine Wachstumsdepression während der ersten Phase des Salzstress durch die verminderte H^+ -Pumpaktivität der Plasmalemma- H^+ -ATPase erklärbar (Veröffentlichung 4).

3.4 Die Rolle der Regulation des Na^+/H^+ -Antiports

Na^+ kann durch Ionenkanäle passiv in Zellen eintreten. In Pflanzen wurden bisher keine hochselektiven Kanäle für Na^+ , die es in exkretorischen tierischen Zellen gibt, gefunden. Wegen der Thermodynamik und der Interaktion zwischen Na^+ und K^+ ist es möglich, das

während der Aufnahme von K^+ auch Na^+ durch K^+ -Kanäle in die Zelle eintreten (Schachtmann, 1999). Eine große Anzahl von hoch selektiven K^+ -Kanälen in der Plasmamembran verschiedener Pflanzentypen konnten identifiziert werden (Amtmann & Sanders, 1999). Nach Schachtmann (1999) sind einwärts gerichtete K^+ -Kanäle hochselektiv gegenüber Na^+ und daher auch nicht für einen signifikanten Netto-Influx von Na^+ verantwortlich. Nicht-selektive Kationenkanäle sind für eine Reihe von monovalenten Kationen permeabel und spielen eher eine Rolle bei der Aufnahme von Na^+ in Wurzelzellen (Amtmann & Sanders, 1999).

Die meisten Kulturpflanzen und auch einige Halophyten tendieren dazu, Na^+ zu exkludieren (Epstein & Bloom, 2005). Salzresistente Pflanzen müssen dazu eine bessere Diskriminierung zwischen der Na^+ - und der K^+ -Aufnahme aufweisen und zusätzlich effizienter Na^+ exkludieren (Schachtmann et al., 1989). Die Wurzeln nahezu aller Pflanzen limitieren die Absorption von Na^+ , falls es dennoch aufgenommen wurde, wird es nur restriktiv in den Spross transportiert, da photosynthetisch aktive Zellen von der Na^+ -Aufnahme abgeschirmt werden müssen: Na^+ , das mit dem Transpirationsstrom aufsteigt, wird von den das Xylem flankierenden Zellen (Xylemparenchymzellen) entzogen und so die Na^+ -Konzentration im Transpirationsstrom der Gefäße vermindert (Wegner & Raschke, 1994). Die Na^+ -Konzentration kann auf diese Weise bereits in den jungen Sprosssteilen minimiert werden. Das Na^+ -Exklusionsvermögen kann getrennt für Spross und Wurzel berechnet werden. Die Aufnahme von Na^+ an der Wurzeloberfläche kann berechnet werden, indem der Na^+ -Gehalt der Gesamtpflanze durch die Wurzelmasse dividiert wird. Die Berechnung der Translokation von Na^+ in das Xylemparenchym erfolgt mittels Division des Na^+ -Gehalts im Spross durch den Na^+ -Gehalt der Wurzel (Veröffentlichung 5 und 7).

Die unterschiedliche Effizienz mit der verschiedene Genotypen einer Pflanzenspezies negative Wirkungen einer NaCl-Exposition vermeiden, hat ihre Ursache in der jeweiligen

Kapazität, Na^+ an der Wurzeloberfläche zu exkludieren und in der differierenden Fähigkeit Na^+ im Xylem zu reabsorbieren. Erst durch diesen Mechanismus können die Blätter vor toxischer Na^+ -Akkumulation bewahrt werden (Schubert & Läuchli, 1990, Veröffentlichung 5, Abb. 6). Die beiden zellulären Mechanismen, die zur Erhaltung einer niedrigen cytosolischen Na^+ -Konzentration beitragen, sind die Na^+ -Exklusion an der Plasmamembran und die Na^+ -Kompartimentierung in der Vakuole (Schubert 1990; Blumwald 2000; Veröffentlichung 5 und 7). Der Na^+ -Transport aus der Zelle ist ein aktiver Prozess, da die Na^+ -Ionen entgegen ihres elektrochemischen Potenzials transportiert werden müssen. In höheren Pflanzen wird der Hauptmechanismus dazu durch die Arbeit einer Plasmamembran- H^+ -ATPase ermöglicht (Barkla et al., 1995, Veröffentlichung 4). Der durch die Protonenpumpe aufgebaute elektrochemische H^+ -Gradient wird von dem Na^+/H^+ -Antiporter genutzt, um die Exklusion von Na^+ aus der Zelle anzutreiben.

Molekularbiologische Arbeiten haben bereits für verschiedene Pflanzen gezeigt, dass generell sowohl ein Plasmamembran-assoziiierter Antiporter (SOS1) als auch ein vakuolärer Na^+/H^+ -Antiporter (NHX) aus Pflanzen isoliert werden konnte (Apse et al., 1999; Veröffentlichung 5). Für Mais konnte bisher aber nur Gene, die für NHX (*ZmNHX*) kodieren, kloniert werden (Veröffentlichung 5, Abb. 2). Die Sequenzen sind unter folgenden Accessions-Nummern in der Gendatenbank (<http://www.ncbi.gov>) zugänglich: AY270036, AY270037, AY270038, AY270039, AY270040 AY270041.

Ein Signalweg für die Regulation von SOS1 (salt overly sensitive), der die Ionen-Homeostase und damit die Salzresistenz beeinflusst, konnte für höhere Pflanzen teilweise aufgeklärt werden (Zhu, 2003). Ein Plasmamembran-assoziiierter Na^+/H^+ -Antiporter SOS1 konnte aber bisher nur aus der dikotylen *Arabidopsis thaliana* (Accessions-Nummer NM126259) kloniert werden. Eigene umfangreiche Versuche zur Klonierung eines homologen Transkripts aus

Mais führen zu der Annahme, dass es kein hoch-homologes Genprodukt zu dem aus *Arabidopsis* bekannten *SOS1* gibt. In der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) finden sich bisher für Mais, wie auch für Reis, keine Sequenzhomologien zu *AtSOS1* mit einem Score von über 70%, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in beiden Pflanzen kein hoch-homologes Gen zum *SOS1* von *Arabidopsis* vorhanden ist (zum Alignment pflanzlicher Antiporter siehe Veröffentlichung 5, Tab. 1).

Aus bisher noch unveröffentlichten Ergebnissen geht jedoch hervor, dass auch in Mais ein Transport von Na^+ über das Plasmalemma messbar ist. Von Fortmeier (unveröffentlicht) konnte mit Hilfe der Acridin-Orange-Technik (Yan et al., 1998) an isolierten Inside-out-Plasmalemma-Vesikeln aus Maiswurzeln ein H^+ -getriebener Transport von Na^+ gemessen werden. Der Transporter ist aber molekularbiologisch bisher noch nicht charakterisiert.

3.4.1 Molekulare Analyse des *SOS1*-Signalweges

Das Umweltsignal „Salzstress“ wird vermutlich von Rezeptoren wahrgenommen, die eine Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktionskette, den in *Arabidopsis thaliana* entdeckten „Salt-Overly-Sensitive (SOS)“-Signalweg, aktivieren (Bressan et al., 1998). Die zentrale Funktion des SOS-Signalweges besteht in der Vermittlung zwischen Ionenhomöostase und Salzresistenz durch die negative Kontrolle der Genexpression von salzinduzierten Genen (Gong et al., 2001). Serrano und Navarro (2001) definieren die Ionenhomöostase bei Salzstress als die Mechanismen der Na^+ -Aufnahme, des Na^+ -Ausstroms und der Natriumtoxizität, sowie die Veränderung dieser Mechanismen während der Stressantwort. Der SOS-Signalweg besteht aus den bisher bekannten Genen *SOS1*, *SOS2* und *SOS3*. *SOS2* und *SOS3* sind Mitglieder des Signalwegs, die einen Na^+/H^+ -Antiporter der Plasmamembran (*SOS1*) kontrollieren (Liu und Zhu, 1997; Hasegawa, 2000; Zhu, 2000). Es konnten in unserer Arbeitsgruppe vier homologe isoforme Fragmente (*SOS2*) des regulativen Elements

aus der SOS-Signalkette des Na^+/H^+ -Antiporters aus Mais identifiziert und kloniert werden (Karl, 2002). Es handelt sich dabei jeweils um Isoformen der Ca^{2+} -abhängigen Serin-Threonin-Proteinkinase. Diese wirkt über eine Phosphorylierung auf die Genexpression des Na^+/H^+ -Antiporters (SOS1) im Plasmalemma. SOS1- und SOS3-homologe Gene konnten bisher nicht gefunden werden (s.o.). Von Chinnusamy et al. (2005) wird diskutiert, dass SOS2 sowohl für die Regulation von SOS1 als auch für NHX verantwortlich ist. Die Anwesenheit eines SOS1-homologen Gen-Transkripts ist kein direkter Beweis für das Vorhandensein eines *AtSOS1*-homologen Transkripts in Mais.

Die Überexpression des Tonoplasten-assoziierten Na^+/H^+ -Antiporters (NHX) in Tomate und *Arabidopsis* führte zu einer signifikanten Verbesserung der Salzresistenz dieser transgenen Pflanzen (Zhang and Blumwald, 2001; Apse et al., 1999). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Inklusion von Na^+ in die Vakuolen. Transgene Pflanzen zeigten signifikant höhere Na^+ -Konzentrationen in Blättern als Wildtyp-Pflanzen. Bei der transgenen Tomate, die NHX überexprimiert, bleibt unklar, inwieweit bei ihr auch Cl^- zur verbesserten Salzresistenz beiträgt. Der Transport von Na^+ in die Vakuole korreliert vermutlich mit einem Transport eines Gegenions. Nach Fortmeier & Schubert (1995) ist Na^+ hauptsächlich für den Salzstress bei Mais verantwortlich. Wenn mit NaCl gearbeitet wird, kann Cl^- jedoch für andere Pflanzen eine wichtige Rolle spielen. In höheren Pflanzen wurden einige spezifische Ionenkanäle für Cl^- gefunden, die für den Transport über Plasmalemma und Tonoplast verantwortlich sind (Schroeder & Hedrich, 1989). Durch eine hohe Kationenaufnahme, wie z.B. im Falle des Na^+ -Influx infolge von Salzstress, wird das Plasmalemma depolarisiert. Die Cl^- -Kanäle werden durch diese Depolarisierung aktiviert. Der hohe Na^+ -Influx begünstigt damit gleichzeitig eine hohe Cl^- -Aufnahme in das Protoplasma. Da die Vakuole im Gegensatz zum Cytosol positiv geladen ist, ist der Cl^- -Transport am Tonoplast hauptsächlich durch eine erleichterte Diffusion geprägt (Schroeder & Hedrich, 1989). Cl^- ist ein wichtiges Osmotikum und kann in Vakuolen

bis zu 300 mM angereichert werden (Schroeder & Hedrich, 1989). Nach Baumeister & Ernst (1985) gilt die Tomate jedoch als wenig chloridverträgliche Pflanze. Wahrscheinlich diffundiert Cl^- gemeinsam mit der Inklusion von Na^+ in die Vakuole und kann dort das Ladungsungleichgewicht balancieren. Dies trägt schließlich zur verbesserten Salzresistenz bei, da hohe Cl^- -Konzentrationen im Cytosol der Tomate toxisch wirken würden. Dieser Aspekt ist leider in den bisher zur Tomate veröffentlichten Artikeln nicht genügend berücksichtigt.

Ein weiterer pflanzlicher NHX-homologer Na^+ -Transporter konnte in der salzresistenten Pappel (*Populus euphratica*) identifiziert werden (Veröffentlichung 6, Abb. 1, 3). *PeNhaD1* kodiert für einen putativen Na^+/H^+ -Antiporter. Das Transkript wurde als erstes Mitglied der NahD-Typ-Transporter-Familie in Pflanzen charakterisiert. Hohe Transkriptmengen des Na^+/H^+ -Antiporters PeNahD finden sich unter Salzstress nur in der salzresistenten *Populus euphratica*, nicht aber in der salzsensitiven *Populus canescens* (Veröffentlichung 6, Abb. 5). In Funktionstests mit einer Nha defizienten *E. coli*-Mutante konnte eine protektive Funktion von PeNhaD bei Salzstress nachgewiesen werden (Veröffentlichung 6, Abb. 6).

Das Prä-Protein von NhaD enthält ein zusätzliches Signalpeptid, welches eine Lokalisierung des Na^+/H^+ -Antiporters in der Plasmamembran ermöglicht. Die Funktion ist dann ähnlich der des AtSOS1, der als Na^+/H^+ -Antiporter in der Plasmamembran fungiert. PeNhaD wird in Blättern und Wurzeln exprimiert und übernimmt dort die Exklusion von Na^+ aus dem Cytosol in den Apoplast.

Der NHX-homologe pflanzliche Na^+/H^+ -Antiporter PeNhaD ist streng pH-Wert abhängig, d.h. eine Aktivierung findet nur unter sauren pH-Werten bis 5,5 statt (Veröffentlichung 6, Abb. 8). Der Transkript-Level ist in gestresstem wie ungestresstem Gewebe gleich hoch. Daher kann postuliert werden, dass PeNhaD eine Funktion bei der Regulierung des pH-Wertes der Zelle spielt. Die protektive Funktion konnte in Versuchen nur unter sauren pH-

Werten nachgewiesen werden (Veröffentlichung 6, Abb. 7) und ist nur dann gewährleistet, wenn der H^+ -Gradient über der Membran ausreichend ist, die Na^+ -Exklusion zu energetisieren.

3.4.2 Na^+ -Exklusion als Strategie zur Realisierung von Salzresistenz

Nach Schubert (1990) werden verschiedene organisatorische Stufen als Strategien der Na^+ -Exklusion definiert, auf denen der Organismus eine schrittweise Reduzierung der Na^+ -Konzentration bis hin zum photosynthetisch aktiven Gewebe realisiert. Da sich salzsensitive und salzresistente Pflanzen nur wenig in ihrer Sensitivität metabolischer Prozesse im Cytoplasma unterscheiden, müssen eine Verhinderung der Na^+ -Akkumulation und die Kontrolle der intrazellulären Ionenhomöostase durch Na^+/H^+ -Antiporter eine entscheidende Rolle in der Salzresistenz von Pflanzen spielen (Liu et al., 2000). Dem passiven Na^+ -Einstrom steht somit ein aktiver Transport der Na^+ -Ionen über Plasmalemma oder Tonoplast gegenüber. Während eine Kompartimentierung von Na^+ -Ionen in der Vakuole und die damit verbundene Nutzung als Osmotikum typisch für Halophyten sind, herrscht bei Glycophyten die Exklusion über die Plasmamembran vor (Kamo et al., 1995). Beide Strategien stellen einen Ansatz für eine Verbesserung der Salzresistenz dar. Die Salzregulation von Mangroven (*Avicennia marina*), die in Meerwasser wachsen, ist durch eine Exklusion von etwa 80% des Salzes pro Volumen Meerwasser an der Wurzeloberfläche gekennzeichnet (Lüttge, 2002). Der Gegensatz zwischen Na^+ -Inkluder und Na^+ -Exkluder ist nach Epstein & Bloom (2005) in der Realität aber nicht vorhanden, Pflanzen nutzen beide Möglichkeiten in unterschiedlichem Maße. Inklusion und Exklusion definieren die Extreme eines Kontinuums an Möglichkeiten in Bezug zur Aufnahme von Salz.

3.4.3 Regulation der Na⁺-Exklusion

Halophyten und Glycophyten verfolgen unterschiedliche Strategien zur Vermeidung einer Schädigung durch Na⁺. Die Inklusion von Na⁺-Ionen in Vakuolen und die damit verbundene Nutzung als Osmotikum ist typisch für Halophyten (Kamo et al., 1995; Mimura et al., 2003). Bei Gerste ist eine verstärkte Na⁺-Inklusion in Vakuolen der Wurzelcortexzellen belegt (Wegner & Raschke, 1994), denn diese Zellen haben in der Regel eine höhere Kapazität für Na⁺ als z.B. Xylemparenchymzellen. Bei Glycophyten wie Mais wurde von einer Akkumulation von Na⁺ im Zentralzylinder berichtet (Pitman et al., 1981; Schubert und Läuchli, 1990). Neuere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Expression des Na⁺/H⁺-Antiporters (*ZmNHX*), der für die Inklusion von Na⁺ in Vakuolen der Wurzel verantwortlich ist, sowohl im Cortex als auch in der Stele der Wurzeln bei Salzstress hoch-exprimiert wird. Die Inklusion von Na⁺ in die Vakuolen des Xylemparenchyms führt darauf hin zu einer Verminderung der Na⁺-Konzentration im Blatt (Neubert et al., 2005). Diese Strategie kann in erster Linie in den Wurzeln, aber auch im Spross beobachtet werden. Na⁺-Ionen werden von den Xylemparenchymzellen aus dem Transpirationsstrom reabsorbiert und dann im Zentralzylinder angereichert (Kramer et al., 1977; Yeo et al., 1977).

Die Regulation des Na⁺/H⁺-Antiporters *ZmNHX* in Mais und Weizen wurde im Spross und in der Wurzel auf RNA-Ebene charakterisiert (Veröffentlichung 5, 7). Die quantitative Real-Time-PCR wurde als hoch sensitives Verfahren für den quantitativen Nachweis der Expression von *ZmNHX* verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ZmNHX* im Maisgenotyp Pioneer 3906 weder im Spross noch in den Wurzeln durch Behandlung der Pflanzen mit 25 mM bis zu 125 mM NaCl verstärkt wird. In den Wurzeln der Na⁺-exkludierenden Inzuchtlinie NaExII wurde dagegen eine Steigerung um den Faktor 5 nach Applikation von 100 mM NaCl aufgezeigt (Veröffentlichung 5, Abb. 3). Die Fähigkeit zur Hochregulation des *ZmNHX*-Antiporters ist also im Laufe der Etablierung der

Inzuchtlinie NaExII eingetreten. Eine entsprechende Selektion und die Ausprägung von homozygoten Allelen in der Inzuchtlinie können dafür verantwortlich sein.

In Veröffentlichung 7 wurde untersucht, inwieweit die Regulation des Na^+/H^+ -Antiporters *TaNHX* als Ursache für die unterschiedliche Salzresistenz von Weizengenotypen einzustufen ist. Dazu wurden zwei unterschiedlich resistente Weizengenotypen untersucht. Der salzresistentere Genotyp (SARC-1) wies die niedrigste Translokation von Na^+ aus der Wurzel in den Spross und die niedrigste Akkumulation in alten Blättern auf (Veröffentlichung 7, Tab. 2, 3). Der resistendere Genotyp wies jedoch im Vergleich zum sensitiven Genotyp höhere Na^+ -Konzentrationen in jungen Blättern auf. Da das Wachstum des resistenten Genotypen stärker war, kann dies nur durch eine effektivere Na^+ -Inklusion in die Vakuolen erklärt werden. Auch das höhere K^+ / Na^+ -Verhältnis im Spross und das niedrigere Verhältnis in der Wurzel des resistenten Genotyps weisen auf eine bessere Retention von Na^+ in der Wurzel dieses Genotyps hin (Veröffentlichung 7, Abb. 1). Die Transkription von *TaNHX* in Wurzel und Spross war im salzresistenten Genotyp ebenfalls signifikant höher als im salzsensitiven Weizengenotyp. Innerhalb der Genotypen konnten für Weizen keine signifikanten Unterschiede in der *TaNHX*-Transkription kortikaler und stelarier Wurzelregionen gefunden werden.

Die höhere Transkription des Na^+/H^+ -Antiporters *TaNHX* in den Wurzeln des resistenten Weizen-Genotyps führt zu einer verminderten Na^+ -Translokation aus der Wurzel in den Spross. Na^+ wird in die Vakuolen von Cortex und Stele in der Wurzel inkludiert und gelangt somit nicht in den Transpirationsstrom. Frühere physiologische Studien (Flowers & Hajibagheri, 2001; Carden et al., 2003) bestätigen diese effiziente Strategie zur Vermeidung erhöhter Na^+ -Konzentrationen in photosynthetisch aktivem Gewebe.

3.5 Entwicklung salzresistenter Maishybriden

3.5.1 Physiologische Parameter zur Verbesserung der Salzresistenz

Die Entwicklung und Verbesserung salzresistenter Kulturpflanzen ist seit Jahrzehnten erklärtes Ziel der Pflanzenwissenschaften. In den letzten Jahrzehnten sind jedoch nur kleine Fortschritte durch konventionelle Selektion und Züchtung zu verzeichnen (Ashraf, 2002; Al-Khatib et al., 1993). Die meisten Selektionsprozeduren basierten dabei auf agronomischen Parametern wie Ertrag, Überleben, Pflanzenhöhe, Blattfläche, Blattschäden, relatives Wachstum oder relative Wachstumsreduktion (Cramer et al., 1990; He & Cramer, 1992; Franco et al., 1993; Noble & Rogers, 1992; Munns 1993; El-Hendawy et al., 2005). Eine elegante und effiziente Möglichkeit wäre, distinkte Indikatoren auf physiologischer Ebene zuweisen zu können. Munns (1993) schlägt vor, die Salzresistenz durch die Aufklärung beteiligter Gene und deren züchterische Einbringung in Kulturpflanzen zu verbessern. Die größte Schwierigkeit bisheriger Ansätze war, dass keine gut definierten pflanzlichen Indikatoren für Salzresistenz vorhanden waren, die einen Nutzen für die Züchtung wichtiger Kulturpflanzen hätten bringen können (Ashraf & Harris, 2004). Beim Screening nach Komponenten komplexer Merkmale wie Salzresistenz liefern physiologische Kriterien objektivere Informationen als agronomische Parameter oder eine lediglich visuelle Begutachtung (Yeo, 1994, Ashaf & Harris, 2004).

Im vorliegenden Ansatz wurden nicht die klassischen Maßnahmen angewendet, sondern gezielt physiologische Befunde eingesetzt und dadurch eine wesentliche Verbesserung der Salzresistenz erzielt. Als Repräsentant für salzsensitive Kulturpflanzen wurde Mais gewählt. Da die Bodenversalzung in den klassischen Maisanbaugebieten eine eminente Rolle spielt, muss der Verbesserung der Salzresistenz von Mais ein erhebliches Maß an wissenschaftlichem und auch an wirtschaftlichem Interesse beigemessen werden.

Die Untersuchungen in Veröffentlichungen 2 und 3 haben gezeigt, dass es bei Mais auf der Ebene der Proteine bereits nach einer kurzzeitigen Applikation von moderatem Salzstress nicht zu einer spezifischen Anpassung kommt. Bei höheren Salzkonzentrationen ist die Reaktion im Proteinmuster herkömmlicher Maisgenotypen bereits so gravierend, dass die Expression von über 80% der löslichen Proteine verändert ist. Diese unspezifische Anpassung führt bereits nach Applikation von neun Tagen mit 100 mM NaCl zu kritischen Na^+ -Konzentrationen in der Zelle (Veröffentlichung 2, Abb. 2B). Die Biomassen und die Wachstumsraten nehmen nach neuntägiger Behandlung mit 100 mM NaCl signifikant ab (Veröffentlichung 2, Abb. 2A; Veröffentlichung 3, Abb. 1). Nach längerer Stressdauer stellen sich typische Symptome ein, wie am Blattrand beginnend Chlorosen bei älteren Blättern, was schließlich bis zum Absterben der Blätter und der gesamten Pflanze führt (Abb. 2). Um die Definition von Larcher (1984) zu paraphrasieren (Kapitel 1.2), verliert Mais bereits unter moderatem Salzstress den Wettlauf zwischen den Anpassungsmechanismen und den zum Tod führenden Prozessen.

Für die erfolgreiche Etablierung salzresistenter Maisgenotypen müssen die Resistenzmechanismen kombiniert werden, die als physiologische Komponenten zum Salzstress beitragen. Wie von Munns (1993) gezeigt wurde und in Veröffentlichung 1 für Mais klar bestätigt werden konnte, besteht Salzstress im Wesentlichen aus zwei Komponenten, die sich jeweils in der frühen und späteren Wachstumsphase ausprägen. In der ersten Phase ist die Wachstumsdepression hauptsächlich durch osmotischen Stress bestimmt, der durch Na^+ verursacht wird, wobei ein kleiner Beitrag zusätzlich von einer durch Na^+ -Ionen verursachten Ionentoxizität herrührt (Veröffentlichung 2). In einer zweiten, zeitlich späteren Phase ist im Wesentlichen die Na^+ -Toxizität für die Wachstumsdepression verantwortlich (Fortmeier, 1990; Schubert & Läuchli, 1990).

3.5.1.1 Entwicklung einer effizient Na^+ -exkludierenden Maisinzuchtlinie

Ziel dieser Arbeiten war es, beide physiologischen Strategien zu kombinieren d.h. die osmotische Resistenz zusammen mit einer Vermeidung von hohen Natrium-Konzentrationen im Cytoplasma in eine Maishybride einzukreuzen.

Mais exkludiert Na^+ an zwei Orten: an der Wurzeloberfläche und in Cortex und Stele der Wurzel (Schubert und Läuchli, 1990, Neubert et al., 2005). Die Maishybride Pioneer 3906 vereinigt durch Kreuzung zweier verschieden exkludierender Inzuchtlinien beide Strategien und zeigt unter Salzbehandlung zwar ein kontinuierliches aber immer noch reduziertes Wachstum (Veröffentlichung 8, Abb. 3). Der Plan, die Salzresistenz bei Mais durch eine effizientere Na^+ -Exklusion zu steigern, führte zur Entwicklung einer Na^+ -Ionen ausschließenden Inzuchtlinie (Veröffentlichung 8, Tab. 2). Die Verbesserungen, die mit dieser Inzuchtlinie erreicht werden sollten, bestanden in der Vereinigung der unterschiedlichen Exklusionsstrategien und eine vergleichsweise bessere Na^+ -Exklusion als Pioneer 3906. Dazu wurde der Hybride Pioneer 3906 geselbstet. Die Na^+ -Konzentration im vierten Blatt wurde als Selektionskriterium ausgewählt und die Pflanzen über sieben Generationen selektiert. Die so entstandene Inzuchtlinie NaExIL zeigte eine große genetische Homogenität im Vergleich zu Pioneer 3906. Die Effizienz der Na^+ -Exklusion, gemessen als Aufnahme an der Wurzeloberfläche, war um ca. ein Drittel verbessert, die Translokation von der Wurzel in den Spross konnte sie sogar halbiert werden (Veröffentlichung 8, Tab. 1). Aus dem Erbgang der Elternline (Pioneer 3906) ist ersichtlich, dass die Na^+ -Exklusion dominant weitervererbt wird (Veröffentlichung 8, Tab. 2). Obwohl die neu erstellte, Na^+ -exkludierende Maisinzuchtlinie NaExIL beide Na^+ -Exklusionsstrategien effektiv vereinigt, ist diese Linie (NaExIL) nicht sehr gut osmotisch angepasst. Daher kann die Na^+ -exkludierende Inzuchtlinie NaExIL nicht als salzresistent bezeichnet werden.

3.5.1.2 Screening auf osmotisch angepasste Maisinzuchtlinien

In einem unabhängigen Versuch fand ein Screening von Maisinzuchtlinien statt, die in der ersten Phase des Wachstums osmotisch angepasst waren. Dazu wurden 200 genetisch nicht verwandte Maisinzuchtlinien, die freundlicherweise von der Firma Südwest Saatzucht GbR zur Verfügung gestellt wurden, unter starkem osmotischen Stress untersucht (Abb. 4).

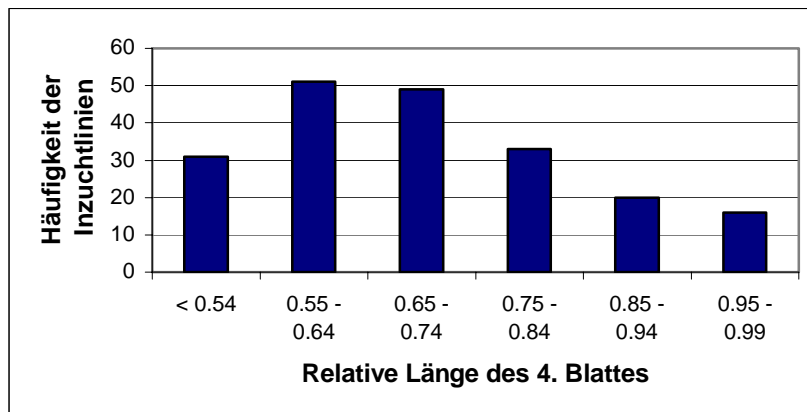


Abbildung 4

Screening auf osmotisch resistente Mais-Inzuchtlinien. 200 Inzuchtlinien (SWS-Saatzucht GbR) wurden in sechs Wiederholungen, respektive Kontrollen, mit 150 mM NaCl behandelt. Die relativen Blattlängen der unter osmotischem Stress gebildeten Blätter wurden gemessen und die Quotienten im Verhältnis zur Kontrolle berechnet.

Die Wachstumsdepression des unter Stress gebildeten Blattes wurde im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen berechnet und als Quotient ausgedrückt. Diejenigen Inzuchtlinien wurden ausgewählt, die Quotienten-Werte von mehr als 0,95 hatten und somit am besten angepasst waren. (Ein Quotient von 1,0 würde ein nicht vermindertes Wachstum der mit 150 mM NaCl-behandelten Pflanze im Vergleich zur Kontrolle anzeigen.) Durch dieses einfache Screening-Verfahren konnten die 16 am besten osmotisch angepassten Maisinzuchtlinien ausgewählt werden.

3.5.2 Entwicklung salzresistenter Maishybriden durch Kombination beider physiologischer Eigenschaften

Im Jahr 2002 wurden die 16 osmotisch angepassten Mais-Inzuchtlinien jeweils mit der effizient Na^+ -exkludierenden Inzuchtlinie NaExIL gekreuzt. Es entstanden 16 unterschiedliche F1-Hybriden (SR-Hybriden). Diese SR-Hybriden wurden ab 2003 in standardisierten Experimenten in Wasserkultur und Gefäßversuchen untersucht. Getestet wurde die Na^+ -Exklusion und die osmotische Resistenz und danach konnten die besten sechs F1-Maishybriden selektiert werden. Aus Veröffentlichung 8, Abb. 4 ist ersichtlich, dass die SR-Hybriden eine stark verbesserte Na^+ -Exklusion gegenüber Pioneer 3906 aufweisen. SR 05 zeigt eine um ca. 30% verminderte Aufnahme von Na^+ an der Wurzeloberfläche und eine um 50% verminderte Translokation aus der Wurzel in den Spross. Die Verbesserung der SR-Hybriden gegenüber dem Hybride Pioneer 3906 muss umso höher bewertet werden, weil dieser im Vergleich zu anderen Genotypen bereits effizient Na^+ exkludiert und eine stark reduzierte Netto-Aufnahme von Na^+ an der Wurzel zeigt (Veröffentlichung 1 und 4). Durch die Kreuzung der effizient Na^+ -exkludierenden Inzuchtlinie NaExIL mit der Inzuchtlinie SWS60 entstand der Hybride SR05, wobei die Na^+ -Exklusion wie erwartet dominant weitergegeben wurde. Die verminderte Aufnahme von Na^+ an der Wurzeloberfläche führte schließlich auch zu einer verminderten Na^+ -Translokation. Diese verminderte Na^+ -Translokation aus der Wurzel in den Spross führt folglich zu einer verminderten Na^+ -Konzentration in photosynthetisch aktivem Gewebe in den Blättern. Dies ist für fünf der SR-Hybriden in Abbildung 5b (Manuskript 8) veranschaulicht. Die Transkription des Na^+/H^+ -Antiporters (*ZmNHX*), der für die Inklusion von Na^+ in Vakuolen der Wurzel verantwortlich ist, wurde mittels Real-Time-PCR untersucht. Im Ergebnis konnte eine Hochregulation des Transkripts in der Hybride SR05 nach einer 100 mM NaCl-Behandlung um ca. 35 % gemessen werden. Weiterhin konnte eine Inklusion von Na^+ in den Vakuolen sowohl im Cortex als auch in der Stele der Wurzeln detektiert werden, die zu einer weiteren

Verminderung der Na^+ -Konzentration im Blatt führt (Neubert et al., 2005). Die verminderte Na^+ -Translokation in den Spross kann also auf zwei Ursachen zurückgeführt werden, zum einen führt die geringere Aufnahme zu einer verminderten Translokation und zum anderen ist die erhöhte Expression von ZmNHX in der Wurzel und im Xylem dafür verantwortlich, dass Na^+ in den Vakuolen festgelegt wird und somit nicht in die Blätter gelangt. Die Verbesserung der Na^+ -Exklusion liefert als eine der beiden Hauptkomponenten einen wichtigen Beitrag zur Salzresistenz.

Die osmotische Komponente der ersten Phase des Salzstressses kann nicht-destruktiv und einfach, mittels des empfindlichen Parameters 'Blattwachstum', beurteilt werden. Wie in Veröffentlichung 8 (Abb. 3) gezeigt wurde, weisen die Blattflächen der SR-Hybriden unter 150 mM NaCl in Wasserkulturversuchen ca. 20 % weniger Wachstumsdepression auf als Pioneer 3906. Die Relationen der Sprossfrischgewichte der unter 150 mM gewachsenen SR-Hybriden, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, waren ebenfalls höher als die von Pioneer 3906. Die verbesserten Wachstumsraten sind auch mit der Regulation der Plasmalemma-ATPase korreliert, die schließlich zu einer verminderten Wachstumsdepression unter Salzstress führt (Veröffentlichung 4). Im Zusammenhang damit steht ebenfalls die verbesserte osmotische Resistenz der SR Hybriden. In den Hybriden SR03 und SR12 war das Blattwachstum unter Salzstress nicht beeinträchtigt, was eine erfolgreiche Vererbung der osmotischen Resistenz in diese Hybriden belegt (Veröffentlichung 9, Abb. 1). Die Wachstumsreduktion in der ersten Phase des Salzstressses ist in vielen Spezies gut dokumentiert, wobei die Reduktion des Sprosswachstums im Allgemeinen deutlicher ist als die der Wurzeln (Cramer et al., 1994; Dodd & Davies 1996; Fortmeier & Schubert, 1995). Es gibt mehrere Gründe für die Wachstumshemmung; von Passioura & Munns (2000) wurde ein verminderter Turgor schon nach einigen Minuten Salzstress gemessen, jedoch erholte sich die Blatt-Expansionsrate schon nach einer halben Stunde. In Veröffentlichung 9 konnte gezeigt

werden, dass der Turgor durch die Erhöhung der Osmolarität des Xylemsafts in den SR-Hybriden während des Salzstress unverändert blieb. Dies verdeutlicht, dass der Turgor keinen nennenswerten Einfluss auf die osmotische Komponente des Salzstress bei Mais hat (Veröffentlichung 9, Abb. 2). Ein weiterer Grund für die Wachstumshemmung könnte die Unterversorgung mit primären Assimilaten sein, die durch eine Störung der Photosynthese hervorgerufen werden könnte (Yang & Lu, 2005). Wie in Veröffentlichung 9 gezeigt wurde, war die Assimilat-Versorgung (Glucose, Fructose und Saccharose) der getesteten Hybriden SR03, SR12 und SR13 unter Salzstress im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle unter Normalbedingungen jedoch nicht beeinflusst (Veröffentlichung 9, Abb. 4). Die Photosynthese der unter Salzstress wachsenden Maispflanzen ist also demnach in der Lage, genügend primäre Assimilate bereit zu stellen.

Eine weitere Komponente, die wesentlicher als der Turgor an der Wachstumshemmung beteiligt ist, wird mit hormonellen Signalen wie z.B. Abscisinsäure (ABA) beschrieben, die durch Salzstress ausgelöst werden und dann das reduzierte Wachstum vermitteln. Bisher gibt es aus der Literatur Hinweise auf eine Wachstumshemmung mit erhöhten ABA-Konzentrationen im Spross (LaRosa et al., 1987; Amzallag et al., 1990; Sharp & LeNoble, 2002), wie auch kontroverse Berichte mit einer Verminderung der ABA-Konzentration (Munns & Cramer, 1996; Cramer et al., 1998; Cramer & Quarrie, 2002). In der ersten Phase des Salzstress kann auch Trockenstress prinzipiell mit den osmotischen Anpassungsproblemen verglichen werden. Dieselben widersprüchlichen Aussagen finden sich bezüglich ABA-Konzentrationen unter Trockenstress (Davies & Zhang, 1991; Wilkinson & Davies, 2002). In Veröffentlichung 9, (Abb. 5, 6) wird klar gezeigt, dass die ABA-Konzentration im unter Salzstress stehenden, wachsenden Blatt der salzresistenten Maishybriden SR03, SR12 und SR13 signifikant erhöht waren.

Die Zusammenstellung der drei aufgeführten Parameter Turgor, Assimilat-Bereitstellung und ABA-Konzentration zeigt, dass die Wachstumsreduktion in der ersten Phase des Salzstress

allein aufgrund der erhöhten ABA-Konzentration im wachsenden Maisblatt ausgelöst wurde. Das unveränderte Wachstum der salzresistenten Maishybriden wird demnach in der ersten Phase des Salzstresses durch eine hohe ABA-Konzentration im wachsenden Blatt aufrechterhalten. Während des Screenings nach osmotisch resistenten Inzuchtlinien, muss folglich eine Selektion nach Pflanzen mit hohen ABA-Konzentrationen während der Stressphase stattgefunden haben. Auch Fricke et al. (2004) konnte zeigen, dass eine erhöhte ABA-Konzentration in der Wachstumszone von Gerste zu einer Wiederaufnahme der ursprünglichen Wachstumsrate nach Salzstress führte. Zusammenfassend konnte belegt werden, dass eine hohe ABA-Konzentration im wachsenden Spross in der ersten Phase des Wachstums für die Verbesserung der Salzresistenz der Maishybriden ausschlaggebend ist.

Die Exklusion von Na^+ an der Wurzeloberfläche und die verminderte Aufnahme von Na^+ in den Spross in Kombination mit der verbesserten osmotischen Resistenz führen zu einer deutlichen Verbesserung der Salzresistenz der SR-Hybriden. Im Gefäßversuch konnten diese Pflanzen bei einer Salzbelastung des Bodens mit einer Leitfähigkeit von 10 dS/m sowohl keimen als auch nahezu unbeeinträchtigt wachsen. Abbildung 5 (aus Veröffentlichung 7, Abbildung 6 und Tabelle 1) zeigt die Kornerträge von fünf SR-Hybriden im Vergleich zu Pioneer 3906 jeweils im Vergleich einer Pflanze unter 10 dS/m NaCl-Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle. Bei Pioneer 3906 kam es zu einer Ertragseinbuße von etwa 40 %, bei SR 08 hingegen nur zu 9%. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ist bei konventionellen Maissorten mit Ertragseinbußen von 100% bei 10 dS/m Bodensalinität zu rechnen (Doorenbos & Kassam, 1979). Der in diesen Untersuchungen als Bezugsgröße verwendete Hybride Pioneer 3906 zeigte im Vergleich zu handelsüblichen Genotypen auch bereits eine deutliche Verbesserung hinsichtlich Ertrag und Salzresistenz.



Abbildung 5

Anbau der Maishybriden SR 05, SR08, SR12, SR15, SR16 und Pioneer 3906 in der Pflanzenwuchshalle. Anbaubedingungen: Mitscherlich-Gefäße, Kleinlindener-Boden, NaCl-Salinität mit 10 dS m⁻¹, jeweilige Kontrollen ohne NaCl. Je vier Pflanzen wurden bis zur Reife in Gefäßen kultiviert. Düngung erfolgte bei Bedarf mit handelsüblichem N-P-K-Dünger. Abgebildet sind alle Kolben der vier Wiederholungen nach Lufttrocknung.

Die gezeigten physiologischen Ergebnisse, wie auch die Ertragsdaten aus dem Gefäßversuch, zeigen, dass die gezielte Verbesserung von Maisgenotypen durch die Kombination physiologischer Strategien möglich ist.

4. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob die Salzresistenz durch die Kombination von physiologischen Merkmalen glycophytischer Gramineen erheblich verbessert werden kann. In den letzten Jahrzehnten wurde von Pflanzenwissenschaftlern vielfach das Ziel verfolgt, die Salzresistenz, im Besonderen von salzsensitiven Kulturpflanzen, zu untersuchen und zu verbessern. Viele ökonomisch wichtige Kulturpflanzen gehören zu den Gramineen, deren Salzresistenz in der Regel nicht besonders ausgeprägt ist. Mais ist zudem eine salzsensitive Pflanze, die dem Problem der Bodensalinität besonders ausgesetzt ist, da dessen Kultur oft mit einer unsachgemäßen Bewässerung in ariden Klimaten einhergeht. Die Bodenversalzung ist nach Schätzungen für etwa ein Drittel der bewässerten Flächen weltweit ein Problem. Um eine Verbesserung der Salzresistenz von glycophytischen Pflanzen wie Mais zu erreichen, ist die Aufklärung der Mechanismen daher von großer Bedeutung.

Die vorliegenden Untersuchungen erlauben folgende Schlussfolgerungen:

1. Salzstress beruht auf zwei wesentlichen physiologischen Komponenten. Durch das Zwei-Phasen-Modell von Munns (1993) wurde zunächst die Grundlage für das Verständnis der physiologischen Mechanismen von Salzresistenz bei glycophytischen Kulturpflanzen gelegt. In der ersten Phase ist der osmotische Stress dominierend, worauf die Pflanze mit Wachstumsdepression reagiert. Für Mais konnte dieses Modell mit einer kleinen Modifikation bestätigt werden, indem angemerkt wurde, dass sich ein zusätzlicher durch Na^+ verursachter Ionen-Effekt auf das Blattwachstum in der ersten Phase auswirkt. Eine zweite Phase, in der die Ioneneffekte dominieren, schließt sich nach 6 bis 8 Wochen an. Für Mais wurde in der zweiten Phase Natrium als das dominierende toxische Ion identifiziert, während Chlorid nur eine untergeordnete Rolle zukam. Die primäre Wirkung der Na^+ -Toxizität konnte als Na^+ -induzierter K^+ -Mangel beschrieben werden. Na^+ -Ionen verdrängen

K^+ -Ionen von den Bindungsplätzen an Proteinen und Enzymen und vermindern oder verhindern so dessen physiologische Funktion. Die Folge sind Chlorosen an Blattspitzen und Blatträndern, die zunächst an älteren Blättern auftreten und schließlich nekrotisch werden.

2. Die initiale, biochemische Reaktion auf der Ebene der Proteine nach einer NaCl-Exposition von Mais und Weizen beruht auf einer unspezifischen Reaktion, nicht auf einer stressspezifischen Adaptation. Schon die Exposition von Mais unter moderatem NaCl-Stress von 25 mM führt innerhalb weniger Tage zur differentiellen Expression von 45% der Proteine. Diese differentiell exprimierten Proteine stammen aus dem Kohlenstoffmetabolismus und aus dem Stickstoffmetabolismus, wobei die Assimilatproduktion auch unter hohem Salzstress nicht limitierend für das Wachstum der Pflanze ist. Weitere Proteine stammen aus der Proteinbiosynthese und -modifikation. Die hier identifizierten Proteine können im Zusammenhang von Salzstress aber auch in den von anderen Stressarten eingeordnet werden, so dass nach der Analyse des Proteoms von salzgestressten Mais- und Gerstepflanzen gefolgert werden kann, dass selbst bei moderatem Salzstress keine für Salzstress spezifischen Proteine detektiert wurden. Die molekulargenetische Veränderung von Einzelgenen in Glycophyten führt daher vielleicht zu augenfälligen Teilerfolgen, wahrscheinlich aber nicht zu umfassenden Effekten bei der Etablierung von salzresistenten Gramineen.

3. Das in erster Linie für vermindertes Blattwachstum verantwortliche Masterenzym ist die Plasmalemma-ATPase. Die säurevermittelte Zellstreckung wird durch Protonen, die in den Apoplast entlassen werden, ermöglicht und ist vermutlich durch Auxin induziert. Eine Ansäuerung der Zellwand führt zu einer Lockerung von Zellwandstrukturen und deren Extension durch die Einlagerung von neuem Zellwandmaterial. Diese Theorie stützend

konnte gezeigt werden, dass die H^+ -Pumpaktivität der Plasmalemma-ATPase unter Salzstress vermindert ist. Die Transkription der Plasmalemma-ATPase war insgesamt unverändert, wobei aber die Isoform Plasmalemma-ATPase *MHA1* vermindert, die Isoform *MHA4* hingegen erhöht war. Dies spricht für eine spezifische Expression von MHA4 unter Salzstress, was zu einer verminderten H^+ -Pumpaktivität bei gleichbleibender hydrolytischer Aktivität führt. Die Zelle reagiert mit einem verminderten Wachstum unter Salzstress, wobei die hydrolytische Aktivität der Plasmalemma-ATPase unbeeinflusst und gewahrt bleibt.

4. Der Na^+/H^+ -Antiport ist ein wichtiger Prozess, um Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma der Zelle zu eliminieren. Dieser Transport ist elektrisch neutral, da ein H^+ gegen ein Na^+ ausgetauscht wird. Der durch die ATPase aufgebaute Protonengradient stellt die Energie für den Antiport bereit. Na^+ kann aus dem Cytoplasma in den Apoplast transportiert werden. Eine wichtige Funktion kommt dem Na^+/H^+ -Antiporter im Tonoplast (NHX) zu, der Na^+ in die Vakuole transportiert. Die Inklusion von Na^+ in die Vakuole ist weiterhin ein für Glycophyten wichtiger Prozess, der zur Salzresistenz verschiedener Genotypen beiträgt. Nach der molekularen Identifikation und Sequenzierung des Na^+/H^+ -Antiporters aus Mais konnten sechs Isoformen aus Wurzel und Spross kloniert werden, die in Mais stressabhängig exprimiert werden. Die verstärkte Transkription des Na^+/H^+ -Antiporters *ZmNHX* in der Maisinzuchtlinie NaExII führte nicht direkt zu einer salzresistenten Pflanze. Ein wahrscheinlich durch Auxin vermitteltes Signal führt bei Na^+ -exkludierenden Maispflanzen unter Trockenheit zu osmotischen Anpassungsproblemen und zu Welkphänomenen.

Ein weiterer Na^+/H^+ -Antiporter konnte in der salzresistenten *Populus euphratica* identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein erstmals untersuchtes Mitglied der Na^+/H^+ -Antiporter-Familie, welches eine zusätzliche Funktion bei der pH-Wert-Regulation hat. Die protektive

Funktion dieses NhaD- Na^+/H^+ -Antiporters ermöglicht ein Wachstum der Pflanzen unter Bedingungen immerhin bis zu 400 mM NaCl.

5. Die Entwicklung von salzresistenten Hybriden wurde mittels klassischer Züchtung erreicht, dazu wurden die Ergebnisse aus physiologischen Analysen berücksichtigt. Die physiologischen Ergebnisse wurden sowohl durch molekularbiologische- und proteinbiochemische Methoden unterstützt. Die Komponenten, die zur Charakterisierung der Salzresistenz untersucht wurden, sind einerseits die Fähigkeit zur Na^+ -Exklusion und andererseits die osmotische Anpassungsfähigkeit der Pflanze. Beide Komponenten wurden unabhängig voneinander über Inzuchtlinien in salzresistenten Maishybriden vereinigt. Es wurden sowohl die geeigneten klassischen als auch molekularbiologischen Methoden und Parameter entwickelt und angewendet, die eine Diagnose physiologischer Prozesse in Pflanzen ermöglicht. Durch die Analyse der Na^+ -Konzentrationen im unter Salzstress wachsenden Blatt war es möglich, Pflanzen aufgrund einer verbesserten Exklusionseigenschaft zu selektieren. In diesem Zusammenhang konnte die Na^+ -Exklusion auf der Ebene von Geweben und auf der Ebene der Zelle näher charakterisiert werden. Die osmotische Komponente wurde anhand des Blattwachstums unter Salzstress gescreent. Die osmotischen Anpassungsprobleme in der ersten Phase des Wachstums konnten bei den salzresistenten Maishybriden durch hohe Abscisinsäure-Konzentrationen in wachsenden Blättern überwunden werden. Die Entwicklung von salzresistenten Maishybriden ist durch die Umsetzung physiologischer Diagnosen durch klassische Kreuzung gelungen. Wachstumsparameter, physiologische Ergebnisse, wie auch die Ertragsdaten zeigen eindrucksvoll die erzielte Verbesserung von Maisgenotypen hinsichtlich ihrer Salzresistenz, die durch das Verständnis physiologischer Mechanismen möglich wurde.

5. Literatur

Al-Khatib M., McNeilly T., Collins J.C. (1993) The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Euphytica* 65, 43-51.

Amberger, A. (1996): Pflanzenernährung, 4. Auflage, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.

Amzallag G.N., Lerner H.R., Poljakoff-Mayber A. (1990) Exogenous ABA as a modulator of the response of sorghum to high salinity. *J. Exp. Bot.* 41, 1529-1534.

Amtmann A., Sanders D. (1998) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29, 75-112.

Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.

Arif H., Tomos A.D. (1993) Control of wheat leaf growth under saline conditions. In: Lieth H., Al Masoom A. (Hrsg.) *Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants*. Kluwer, London pp 45-52.

Aronson J.A. (1989) HALOPH, a database of salt tolerant plants in the world. University of Arizona, Office of Arid Land Studies.

Ash F., Dingkuhn M., Miezani K., Dörffling K. (2000) Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. *Euphytica* 113, 109-118.

Ashraf M., Harris P.J.C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166, 3-16.

Ashraf M. (2002) Salt tolerance of cotton: some new advances, *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 1-30.

- Atkinson M.R., Findlay G.P., Hope A.B., Pitman M.G., Saddler H.D.W., West K.R. (1967) Salt regulation in the mangroves *Rhizophora mucronata* L. and *Aegialitis annulata* R. Br. Austral. J. Biol. Sci. 20, 589-599.
- Ball M.C. (1988) Salinity tolerance in the mangroves *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina*. I. Water use in relation to growth, carbon partitioning, and salt balance. Austral. J. Plant Physiol. 15, 447-464.
- Barkla B.J., Zingarelli L., Blumwald E., Smith J. (1995) Tonoplast Na^+/H^+ antiport activity and its energization by the vacuolar H^+ -ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant Physiol. 109, 549-556.
- Baumeister W., Ernst W. (1978) Mineralstoffe und Pflanzenwachstum. G. Fischer Verlag Stuttgart.
- Blumwald E., Aharon G.S., Apse M.P. (2000) Sodium transport in plant cells. Biochim. Biophys. Acta, 1465, 140-151.
- Boyer J.S. (1982) Plant productivity and environment. Science 218, 443-448.
- Bressan R.A. (1998) Plants use calcium to resolve salt stress. Trends Plant Sci. 3, 411-412.
- Briskin D.P. (1986) Plasma membrane H^+ -translocating ATPase: Role in potassium ion transport? Physiol. Plant. 68, 159-163.
- Brown A.D. (1990) Microbial Water Stress Physiology, Principles and Perspectives. Wiley New York.
- Buschmann P.H., Vaidyanathan R., Gassmann W., Schroeder J.I. (2000): Enhancement of Na^+ uptake currents, time dependent inward-rectifying K^+ channel transcripts by K^+ starvation in wheat root cells. Plant Physiol. 122, 1387-1397.
- Carden D.E., Walker D.J., Flowers T.J., Miller A.J. (2003) Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na^+ and K^+ to salt tolerance. Plant Physiol. 131, 676-83.

Chazen O., Hartung W., Neumann P.M. (1995) The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant Cell Environ.* 18, 727-735.

Chinnusamy V., Jagendorfer A., Zhu J.-K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437-448.

Cosgrove D.J. (1993) How do plant cell walls extend? *Plant Physiol.* 102, 1-6.

Cramer G.R., Epstein E., Läuchli A. (1990) Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stressed barley. *Physiol. Plant.* 80, 83-88.

Cramer G.R., Bowman D.C. (1992) Kinetics of maize leaf elongation. II. Responses of a sodium excluding cultivar and a Na-including cultivar to varying Na/Ca salinity. *J. Exp. Bot.* 43, 1857-1864.

Cramer G.R., Alberico G.J., Schmidt C. (1994) Leaf expansion limits dry matter accumulation of salt stressed maize. *Aust. J. Plant Physiol.* 21, 663-674.

Cramer G.R., Krishnan K., Abrams S.Z. (1998) Kinetics of maize leaf elongation. IV. Effects of (+)- and (-)-abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 49, 191-198.

Cramer G.R. & Quarrie S.A. (2002) Absciscic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Funct. Plant Biol.* 29, 111-115.

Davies W.J. & Zhang J.H. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, 55-76.

Dodd I.C., Davies W.J. (1996) The relationship between leaf growth and ABA accumulation in the grass leaf elongation zone. *Plant Cell Environ.* 19, 1047-1056.

Doorenbos J., & Kassam A.H. (1979) Yield response to water. FAO Irrigation and Drainage Paper DA, US Dept. Agr. Hbk. 60, pp 160.

El-Hendawy S., Hu Y., Schmidhalter U. (2005) Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. Austral. J. Agricult. Res. 56, 123-134.

Ellenberg H. (1974) Zeigerwerte der Gefäßpflanzen Mitteleuropas. Scripta Geobotanica 9, pp 97.

Epstein E. & Bloom A.J. (2004) Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Flowers T.J., Hajibagheri M.A. (2001) Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. Plant Soil 231, 1-9.

Flowers T.J., Yeo, A.R. (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next?, Austr. J. Plant Physiol. 22, 875-884.

Fortmeier H. (2000) Na⁺-Antiport in Maiswurzeln? *In vitro*-Untersuchungen zum Mechanismus des aktiven Na⁺-Transports am Plasmalemma von Maiswurzeln (*Zea mays* L.). Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Fortmeier R., Schubert S. (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. Plant Cell Environ. 18, 1041-1047.

Franco J.A., Esteban C., Rodriguez C. (1993) Effects of salinity on various growth stages of muskmelon cv. Revigal. Hort. Sci. 68, 899-904.

Frey W., Lösch R. (1998) Lehrbuch der Geobotanik, G. Fischer-Verlag, Stuttgart.

Frias I., Caldeira M.T., Pérez-Castiñeira J.R., Navarro-Aviñó J.P., Culiañez-Maciá F.A., Kuppinger O., Stransky H., Pages M., Hager A., Serrano R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H^+ -ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8, 1533-1544.

Fricke W. Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G. (2004) Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *J. Exp. Bot.* 55, 1115-23.

Gassmann W., Rubio F., Schroeder J.I. (1996) Alkali cation selectivity of the water root high-affinity potassium transporter HTK1. *Plant J.* 10, 869-882.

Gibrat R., Grouzis J.-P., Rigaud J., Grignon C. (1990) Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. II. H^+ -pumping in native and reconstituted vesicles with purified ATPase. *Plant Physiol.* 93, 1183-1189.

Gong Z., Koiwa H., Cushmann M.A., Ray A., Bufford D., Koeeda S., Matsumoto T.K., Zhu J., Cushman J.C., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (2001) Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiol.* 126, 363-375.

Gorham J. & Wyn Jones G. (2002) In: *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Läuchli A., & Lüttge U., (Hrsg.) Kluwer Academic, Dodrecht, Netherlands. pp 113-135.

Greenway H., Munns R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Rev. Plant Physiol.* 31, 149-190.

Hager A. (2003) Role of the plasma membrane H^+ -ATPase in auxin-induced elongation growth: Historical and new aspects. *J. Plant Res.* 116, 483-505.

Hager A., Menzel H., Krauss A. (1971) Versuch und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* 100, 47-75.

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463-99.

He T., Cramer G.R. (1992) Growth and mineral nutrition of six rapid-cycling *Brassica* species in response to seawater salinity. *Plant Soil* 139, 285-294.

Hill A.E., Hill B.S. (1976) Mineral ions. *Encyclopedia of Plant Physiol.* New series 2B, 225-243.

Hohl M., Schopfer P. (1991) Water relations growing maize coleoptiles. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol.* 95, 716-722.

Hu Y., Schmidhalter U. (1997) Interactive effects of salinity and macronutrient level on wheat. 2. Composition. *J. Plant Nutr.* 20, 1169-1182.

Hu Y., Camp K.H., Schmidhalter U. (2000) Kinetics and spatial distribution of leaf elongation of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline soil conditions. *Int. J. Plant Sci.* 161, 575-582.

Hu Y., Fromm J., Schmidhalter U. (2005) Effect of salinity on tissue architecture in expanding wheat leaves. *Planta* 220, 838-848.

Hu Y., Schmidhalter U. (2004) Spatial distribution and net deposition rates of mineral elements in the elongating wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf under saline soil conditions. *Planta* 204, 212-219.

Hu Y. & Schmidhalter U. (2004) Limitation of Salt Stress to Plant Growth. In: *Plant Toxicology*, Fourth Edition, (Hrsg. Hock & Elstner). Marcel Dekker Inc. New York, 191-224.

Hu Y. & Schmidhalter U. (2005) Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 541-549.

Huiskes A.H.L. (1994) A contribution of vegetable crops by research on the cultivation methods and selection of halophytes. 273 p. EU AIR Report, Yerseke, Netherlands, Center for Marine Research.

Jeong M.J., Park S.C., Byun M.O. (2001) Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene transfer. *Mol. Cells* 31, 185-9.

Kamo M., Kawakami T., Miyatake N., Tsugita A. (1995) Separation and characterisation of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 423-430.

Karl S. (2002) Die Rolle des regulativen Elementes Salt Overly Sensitive 2 (SOS2) von Maiswurzeln. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenernährung, Justus-Liebig-Universität-Giessen.

Kemp D.R. (1980) The location and size of the extension zone of emerging wheat leaves. *New Phytol.* 84, 729-737.

Kinzel H. (1982) Pflanzenökologie und Mineralstoffwechsel. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.

Koyro H.-W., Huchzermeyer B. (2002) Ecophysiological mechanisms leading to salinity tolerance – Screening of cash crop halophytes- *Recent Res. Dev. Plant Sci.* 1, 187-202.

Kramer D., Läuchli A., Yeo A.R., Gullasch J. (1977) Transfer cells in roots of *Phaseolus coccineus*: ultrastructure and possible function in exclusion of sodium from the shoot. *Ann. Bot.* 41, 1031-1040.

Kutschera U. (1994) The current status of the acid-growth hypothesis. *Tansley Review No.* 66. *New Phytol.* 126, 549-569.

LaRosa P.C., Hasegawa P.M., Rhodes D., Clithero J.M. (1987) Absciscic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 85, 174-181.

Larcher W. (1984) Ökologie der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.

Läuchli A., Lüttge U. (2002) Salinity: Environment – Plants – Molecules. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Boston, London.

Läuchli A., Epstein E. (1990) Plant Responses to Saline and Sodic Conditions. In: Tanji K.K.: Agricultural salinity assessment and management. American Society of Civil Engineers, New York.

Levitt J. (1980) Responses of Plants of Environmental Stresses (Vol. 1): Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press, Inc., London, UK.

Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.S., Zhu J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 3730-3734.

Liu J., Zhu J.K. (1997) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 14960-14964.

Liu J., Zhu J.K. (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis* – evidence for a critical role of potassium nutrition. Science 280, 1943-1945.

Lüttge U. (2002) Mangroves. In: Salinity: Environment-Plants-Molecules. Läuchli A., and Lüttge U., eds. Kluwer Academic, Dodrecht, Netherlands. pp 113-135.

Lynch J., Läuchli A. (1984) Potassium-transport in salt-stressed barley roots. Planta 161, 295-301.

Maas E.V., Hoffman G.J. (1977) Crop salt tolerance current assessment. Irrig. Drain. Div. ASCE 103, 115-134.

Marschner H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London - New York - San Diego - Boston - Sydney - Tokyo - Toronto, pp 889.

- Martin E. (2004) Gewebsspezifische Untersuchung der Expression des Na^+/H^+ -Antiporters (*ZmNHX*) in zwei Maishybriden (SR-Hybriden) unter Salzstress. Bachelorarbeit, Institut für Pflanzenernährung, Justus-Liebig-Universität-Giessen.
- McLaughlin S.B., Wimmer R. (1999) Transley review No. 104 - Calcium physiology terrestrial ecosystem processes. *New Phytol.* 142, 373-417.
- Michael B., Kaufmann M.R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 69, 1145-1149.
- Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M., Washitani-Nemoto S. (2003) Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta* 216, 397-402.
- Mühling K.-H., Läuchli A. (2002) Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *J. Plant Phys.* 159, 137-146.
- Munns R. (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16, 15-24.
- Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239-250.
- Munns R., Cramer G.R. (1996) Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid? *Plant Soil* 185, 33-49.
- Neubert A.B., Zörb C., Schubert S. (2005) Expression of vacuolar Na^+/H^+ antiporters (*ZmNHX*) and Na^+ exclusion in roots of maize (*Zea mays* L.) genotypes with improved salt resistance. In: *Plant Nutrition for Food Security, Human Health and Environmental Protection* (C. J. Li et al., eds.) Tsinghua University Press, Beijing, China, pp. 544-545.

Neumann P.M. (1993) Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant Cell Environ.* 16, 1107-1114.

Noble C.L., Rogers M.E. (1992) Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant Soil* 146, 99-107.

Okamoto-Nakazato A., Takahashi K., Katoch-Semba R., Katou K. (2001) Distribution of yieldin, a regulatory protein of the cell yield threshold in etiolated cowpea seedlings. *Plant Cell Physiol.* 42, 952-958.

O'Neill S.D., Spanswick R.M. (1984) Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol.* 75, 586-591.

Passioura J.B., Munns R. (2000) Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Austr. J. Plant Physiol.* 27, 941-948.

Pasternak D. (1990) Fodder production with saline water. The institute for applied research, Ben Gurion University of the Negev. Project report BGUN-ARI-35-90. Beer-Sheva/Israel. p 173.

Pérez-Alfocea F., Estan M.T., Caro M., Gurrier G. (1993) Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiol. Plantarum* 87, 493-498.

Pitman M.G., Wellfare D., Carter C. (1981) Reduction of hydraulic conductivity during inhibition of exudation from excised maize and barley roots. *Plant Phys.* 67, 802-808.

Rengel Z. (1992) The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15, 625-632.

Rhodes D.A., Nadolska-Orczyk A., Rich P.J. (2002) Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Läuchli A., and Lüttge U., eds. Kluwer Academic, Dodrecht, Netherlands. pp 181-204.

Richards L.A. (1954) Diagnosis and improvements of saline and alkali soils. Agriculture Handbook No. 60 U.S.D.A, Washington, D.C.

Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. Proc. Nat. Amer. Sci. 98, 14150-14155.

Schachtmann D., Liu W. (1999) Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake. Trends Plant Sci. 4, 281-287.

Schachtschabel P., Blume H.-P., Brümmer G., Hartge K.H., Schwertmann U. (1998) Scheffer/Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, 14. Auflage.

Schubert S. (1990) Natriumexklusion von Maiswurzeln und ihre Bedeutung für die Salzresistenz der Pflanze. Habilitationsschrift, Fachbereich Ernährungs- und Haushaltswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Schmidhalter U., Burucs Z. Camp K.H. (1998) Sensitivity of root and leaf water status in maize (*Zea mays*) subjected to mild soil dryness. Aust. J. Plant Physiol. 25, 307-316.

Schroeder J.I., Hedrich R. (1989) Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. Trends Biochem. Sci. 14, 187-92.

Schubert S., Läubli A. (1990) Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. Plant Soil 123, 205-209.

Sehmisch S. (2004) Molekulare Charakterisierung von Isoformen der Plasmalemma-H⁺-ATPase aus Wurzeln der Weißlupine (*Lupinus albus* L.) bei unterschiedlicher Phosphaternährung. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenernährung, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Serrano R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: Toxicity targets and defense responses. Int. Rev. Cytol. 165, 1-52.

Serrano R., Rodriguez-Navarro A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 399-404.

Shannon M.C. (1984) Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In: *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement* (R.C. Staples and G.H. Toennissen, Hrsg.) J. Wiley and Sons NY, 231-254.

Sharp R.E., LeNoble M.E. (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.* 53, 33-37.

Smart L.B., Vojdani F., Maeshima M., Wilkins T.A. (1998) Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol.* 116, 1539-49.

Suhayda C.G., Giannini J.L., Briskin D.P., Shannon M.C. (1990) Electrostatic changes in *Lycopersicon esculentum* root plasmamembrane resulting from salt stress. *Plant Physiol.* 93, 471-478.

Sümer A. (2002) Entwicklung einer Natrium ausschließenden Maislinie und die Bedeutung der Ionentoxizität für das vegetative Wachstum von Mais (*Zea mays* L.) während der ersten Phase eines Salzstress. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Szabolcs I. (1987) The global problems of salt-affected soils. *Acta Agronomica Hungarica*, 36, 159-172.

Szabolcs I. (1994) Soils and salinization. In: M. Pessarakili (Hrsg.) *Handbook of Plant Nutrition and Crop Stress*. Marcel Dekker, New York., pp 3-11.

Taiz L. (1984) Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 585-657.

Tardieu F., Reymond M., Hamard P., Granier C. Muller B. (2000) Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *J. Exp. Bot.* 51, 1505-1514.

- Tazuke A. (1997) Growth of cucumber fruit as affected by the addition of NaCl to nutrient solution. J. Japanese Society for Horticultural Sci. 78, 19-27.
- Tebbe A., Klein C., Bisle, B., Siedler F., Scheffer B., Garcia-Rizo C., Wolfertz J., Hickmann V., Pfeiffer F., Oesterhelt D. (2005) Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarium* and its implication for genome annotation. Proteomics 5, 166-179.
- Termaat A, Passioura JB, Munns R (1985) Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. Plant Physiology 77, 869-872.
- Tester M, Davenport R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Annu. Bot. 91, 503-27.
- Van Volkenburgh E., Boyer J.S. (1985) Inhibitory Effects of water deficit on maize leaf elongation. Plant Physiol. 77, 190-194.
- Von der Ruhren N. (2003) Verlag: Klett-Perthes, Gotha Seite: www.klett-verlag.de/geographie/terra-extra.
- Larcher W. (1984) Ökologie der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart 4. Auflage.
- Wagner G. In Extremophile : Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen / Hrsg. Klaus Hausmann 2. Aufl. Weinheim: VCH, 1995.
- Wegner L.H., Raschke K. (1994) Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots. A procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels. Plant Physiol. 105, 799-813.
- Wei W.X., Bilsborrow P.E., Hooley P., Finschham D.A., Lombi E., Forster B.P. (2003) Salinity induced differences in growth. Ion distribution and partitioning in barley between the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise. Plant Soil 250, 183-191.

Wilkinson S. & Davies W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 25, 195-210.

Wyn Jones R.G., Pollard A. (1993) Proteins, enzymes and inorganic ions. In: A. Läuchli and R.L. Bileski (Hrsg.). *Inorganic Plant Nutrition. Encyclop. Plant Physiol.* 15b, Springer Verlag pp. 528-555.

Xing T., Ouellet T., Miki B. L. (2002) Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7, 224-230.

Yan S., Tang Z., Su W., Sun W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5, 235-244.

Yan F., Feuerle R., Schäffer S., Fortmeier H., Schubert S. (1998) Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiol.* 117, 311-319.

Yan F., Zhu Y., Müller C., Zörb C., Schubert S. (2002) Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupine under phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 129, 50-63.

Yang X. & Lu C. (2005) Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants. *Physiol. Plant.* 124, 343-352.

Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. (1982) Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1222.

Yeo A. (1994) Physiological criteria in screening and breeding: In: *Soil Mineral Stresses, Approaches to Crop Improvement*. Pp. 11-36 Yeo A. and Flowers T. Eds., Springer-Verlag, Berlin.

Yeo A.R., Kramer D., Läuchli A. (1977) Ion distribution in salt-treated mature *Zea mays* roots in relation to ultrastructure and retention of sodium. *J. Ex. Bot.* 28, 17-29.

Zhang H.X., Blumwald E. (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech.* 19, 765-768.

Zhu J.K. (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 941-948.

Zhu J.K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 441-445.

Zörb C., Weisert A., Stapelmann J., Smolik G., Carter D., Wright B.S., Brunner K.D., Wagner G. (2002) Bacteriorhodopsin crystal growth - Effects of short duration versus long duration microgravity conditions in CPCF and DCAM. *Micrograv. Sci. Technol.* 3, 22-29.

Zörb C., Schmitt S., Neeb A., Karl S., Linder M., Schubert S. (2004) The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Sci.* 167, 91-100.

6. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schubert der es ermöglicht hat, dass ich als wissenschaftlicher Assistent in der Pflanzenernährung tätig sein konnte und dass stets eine sehr anregende wissenschaftliche Diskussion über Konzeption und Ergebnisse wissenschaftlicher Arbeiten geführt wurde. Das gute freundschaftliche Verhältnis und die Hilfsbereitschaft von Herrn Prof. Schubert und Herrn Prof. Mühling hat ebenfalls zum guten Gelingen meiner Forschungs- und Lehrtätigkeit im Institut für Pflanzenernährung beigetragen. Für das sehr gute Arbeitsklima im Institut für Pflanzenernährung in Giessen und für den regen Gedankenaustausch möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen im Institut besonders danken. Die Gespräche mit meinen Freunden am Institut haben mir bei wissenschaftlichen Fragen wie auch in sonstigen Angelegenheiten sehr viel weitergeholfen. Frau Anne Weber und Frau Tina Volk gilt mein besonderer Dank für die technisch einwandfreie Durchführung vieler Arbeiten die manchmal auch über das dienstlich vorgeschriebene zeitliche Maß hinaus möglich waren. Die Betreuung der vielen Pflanzen in der Versuchsstation war erst durch die Arbeit von Frau Tripp, Herrn Wilming und Frau Alles möglich, wofür ich ebenfalls sehr dankbar bin. Den technischen Mitarbeitern des Instituts Frau Plachta und Herrn Pfanschilling, Frau Rödiger und Frau Lein danke ich für die jeweiligen Arbeiten die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Frau Beckermann danke ich für das verlässliche Organisationsgeschick das sie auch für mich einsetzte. Herrn Prof. Dr. Steffens danke ich für die vielen Diskussionen die zur Erkenntnis fachlicher und dienstlicher Zusammenhänge beigetragen haben. Ich habe sehr gerne im Institut für Pflanzenernährung gearbeitet.

Der SWS-Saatgut AG, Rastatt danke ich für die Bereitstellung von Maisinzuchtlinien aus ihrem Sortiment.

Der DFG danke ich für die Finanzierung von 3 Projekten.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich ganz besonders für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

